Abteilung Transfusionsmedizin der Universität Ulm,
Leiter Professor Dr. H. Schrezenmeier

Erprobung eines neuen Verfahrens zur Selektion von Stammzellen aus peripherem Blut

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von

Andreas Voigt (aus Göppingen)

2003

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. R. Marre
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. B. Kubanek
2. Berichterstatter:	PD Dr. D. Bunjes
Tag der Promotion:	27. Mai 2004

All jenen die sich der Ausbildung und Weiterbildung in der Medizin verpflichtet fühlen

Seite

Inhaltsverzeichnis

1	**Einleitung**	
1.1	Geschichtlicher Hintergrund	7
1.2	Selektionsverfahren für Knochenmarkstransplantate	10
1.2.1	Behandlung von Knochenmarkstransplantaten durch Negativselektion	10
1.2.2	Verfahren der Positiv- Selektion von Knochenmarks-Stammzellen und peripheren Stammzellen	11
1.2.2.1	Zellselektion durch Dynalbeads (Isolex 300i®)	12
1.2.2.2	Positivselektion mit paramagnetischen Nanobeads	15
1.2.2.3	Das Immunoadhärenzverfahren	16
1.2.2.4	Das Verfahren der Immunoadsorption	16
1.2.2.5	Die Flowzytometrie	17
1.2.2.6	Nicht auf Zellselektion beruhende Transplantationsmethoden	19
1.3	Polyacrolein- Microspheres als Vektor für die Zellselektion	19
1.4	Fragestellung der Arbeit	20
1.5	Datenerhebung und Wiedergabe in der Arbeit	21
2	**Material und Methode**	
2.1	Polyacrolein Microspheres	22
2.1.1	Herstellungsprozess	22
2.1.2	Charakteristika der verwendeten Kapillaren	23
2.2	Antikörperwahl	24
2.3	Übrige Gebrauchslösungen	25
2.4	Vorversuche mit Zellen	26
2.5	Versuche zur Antikörperbindung	31
2.6	Versuche zur Anlagerung und Ablösung von Zellen	33
2.6.1	Experimente unter Verwendung einer Säule	35
	Anmerkung zur Statistik	44

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche mit Zellen 45

3.2 Versuche zur Antikörperbindung 46

3.3 Ablösen von Sekundärantikörpern 48

3.4 Versuche zur Anlagerung und Ablösung von Zellen 48

3.5 Experimente unter Verwendung einer Säule 52

4 Zusammenfassung der Ergebnisse

4.1 Erkenntnisse aus den Versuchen zur Proteinbindung 65

4.2 Klumpung des Zellmaterials 65

4.3 Unspezifische Bindung 66

4.4 Verfahren der Erfolgskontrolle und Recovery 67

4.5 Viabilität 68

4.6 Spezifität der Zellselektion 68

4.7 Fazit 69

5 Diskussion

5.1 Die Bearbeitung der „technischen“ Aspekte 70

5.2 Die Vergleichbarkeit mit bereits existierenden Verfahren 71

5.3 Kritische Betrachtung der Untersuchungsbedingungen und Durchführung der Arbeit 73

5.4 Kritische Betrachtung des Untersuchungsmaterials Microspheres 74

5.5 Schlussbemerkung 76

6 Zusammenfassung der Arbeit 77

7 Literaturverzeichnis 79

8 Danksagung 84

9 Anhang zum Material- und Methodenteil 85

zum Ergebnisteil 97

Verzeichnis der Abkürzungen

Ak	Antikörper
ALWP	Adult Leucaemia Working Party des United Kingdom Myeloma Forum
Amn	Kapillare mit aktiven Amingruppen
bAmin	Kapillare mit geblockten Amingruppen
BSA	Bovine Serum Albumin
EDTA	Äthylendiamintatraessigsäure
Gls	unbehandelte Glaskapillare
GvHD	Graft-versus-Host Krankheit
HLA System	Human Leukocyte Antibody Sytem
KM, KMT	Knochenmark, Knochenmarkstransplantation
Mic	Kapillare mit aktiven Amingruppen und Microspheres
bMic	Kapillare mit geblockten Amingruppen und Microspheres
MNC Fraktion	Mononuclear Cell Fraktion; *Synonym:* Ficoll ® Fraktion
PBSC	Periphere Blood Stem Cells
PBS o. Ca	Phosphate Buffered Saline ohne Kalcium

1 Einleitung

Im Rahmen der Dissertation soll untersucht werden, ob Kapillaren mit Polyacrolein-Kügelchen "Microspheres" besetzt, ein geeignetes System darstellen, um bestimmte Targetzellen aus peripherem Blut zu selektieren.

Hintergrund und Umfeld der Arbeit sowie Literaturbesprechung

Die hochdosierte Chemotherapie, sowie die Ganzkörperbestrahlung mit myeloablativer Bestrahlungsdosis gefolgt von Stammzelltransplantation, ist eine effektive und anerkannte Therapieform bei zahlreichen hämatologischen Erkrankungen (1, 2) sowie zum Teil auch bei soliden Tumoren (3-6).
Neben dem Standardverfahren der allogenen Knochenmarkstransplantation unter Verwendung von steril gewonnenem Knochenmarksaspirat, wurde in den zurückliegenden Jahren die Transplantation von autologen und allogenen hämatopoetischen Stammzellen aus peripherem Blut als Alternative entwickelt.

1.1 Geschichtlicher Hintergrund

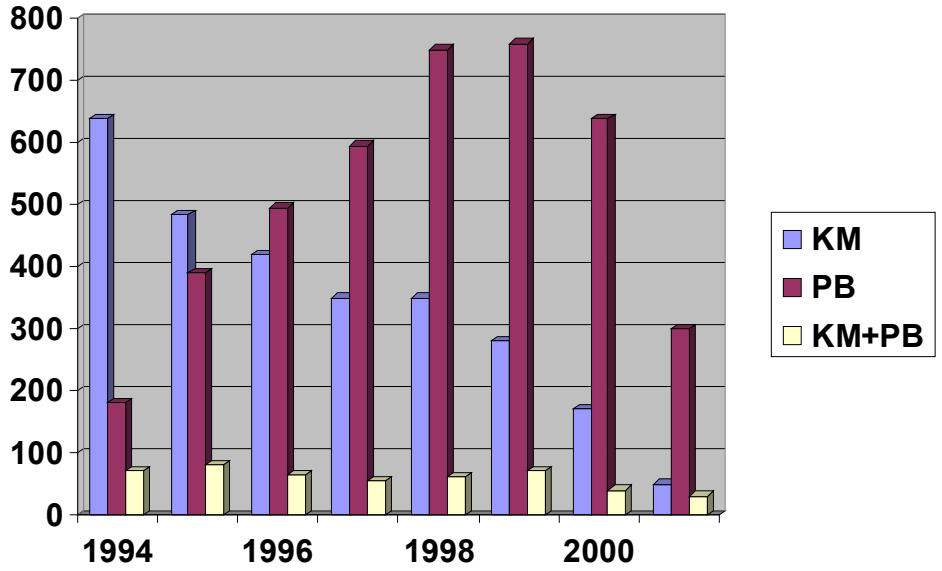
Die Transplantation von blutbildenden Zellen am Menschen begann Ende der 50er Jahre des letzten Jahrhunderts. Bis Anfang der 70er Jahre waren die Ergebnisse von Transplantationen wenig ermutigend. Erst mit der Identifikation des Haupthistokompabilitätskomplexes, oder HLA (Human Leukocyte Antigen) System, gelang es durch Typisierung von peripherer Blutzellen von Sender und Empfänger vergleichbare Reaktionsmuster zu identifizieren. Auf diesem Weg konnte ein für den Patienten HLA- verträglicher Spender ausgewählt werden.
Neben der Identifikation geeigneter Spender mittels HLA- Typisierung trugen verbesserte supportive Therapiemodalitäten wie Blutzellübertragung, Antibiotika, sowie Fortschritte in der immunosuppressiven Therapie zum Erfolg der Knochenmarkstransplantation bei.
Das Bestreben die Knochenmarkstransplantation durch ein weniger invasives und sichereres Verfahren abzulösen hat seit den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts zur Entwicklung von Verfahren geführt, die auf der Nutzung der im peripheren Blut zirkulierenden Knochenmarksstammzellen beruhen.

Die Verwendung peripherer Stammzellen hat gegenüber Knochenmarksaspiraten eine Reihe von Vorteilen: (7) Die Zellen können auf mehrere Sitzungen verteilt ohne Narkose oder Regionalanästhesie gewonnen werden. Die hämatopoetische Rekonstitution verläuft schneller nach der Reinfusion von hämatopoetischen Stammzellen als nach autologer Knochenmarkstransplantation. Die Stammzellsuspension ist verglichen mit unseparietem Knochenmarksaspirat zu einem geringeren Grad mit Tumorzellen kontaminiert (8). Die Wahrscheinlichkeit eine Graft-versus-Host Krankheit, vermittelt durch reife T- Lymphozyten, auszulösen ist nach Stammzellseparation deutlich gemindert (9). Als Nachteil der peripheren Stammzelltransplantation kann die zeitintensivere Zellgewinnung angeführt werden, sowie die Notwendigkeit der „Mobilisation“ der hämatopoetischen Stammzellen durch Chemotherapeutika.

Obwohl sich die im folgenden beschriebenen Verfahren der Zellseparation gleichermaßen an peripheren Blut wie auch an Knochenmarksaspiraten zur Gewinnung von Stammzellen durchführen lassen, wurde in den zurückliegenden Jahren die Gewinnung von Stammzellen aus Knochenmark zugunsten der peripheren Stammzellgewinnung deutlich zurückgedrängt.

Im Jahre 1999 wurden in Europa insgesamt 21.430 hämatologische Transplantationen durchgeführt. Bei 95% der autologen Transplantationen und 45% der allogenen Transplantationen wurden Stammzellen aus peripherem Blut übertragen. Von 18.720 Ersttransplantationen waren 12.841 (69%) autolog und 5.879 (31%) allogen. (10)

Aus den genannten Zahlen wird deutlich, dass im überwiegenden Anteil der Transplantationen periphere Stammzellen eingesetzt wurden. Das folgende Diagramm zeigt am Beispiel des ALWP (Adult Leucaemia Working Party) Registers den Übergang von Ausgangsmaterial Knochenmarkspräparat zum Ausgangsmaterial periphere Stammzellen.



Verschiebung von der Knochenmarks- zur autologen Stammzelltransplantation in den Jahren 1994 - 2001

Veröffentlicht von EBMT März 2002 aus dem ALWP Register 01/94 bis 12/2001

Datenerhebung für 2001 noch nicht abgeschlossen

KM: Knochenmarksaspirat

PB: periphere Stammzellen

KM+PB: kombiniertes Verfahren

Abbildung 1

Zielsetzung der Zellselektion

Ziel der Stammzellselektion aus Knochenmark wie aus peripherem Blut ist zum einen unerwünschte Zellpopulationen wie Tumorzellen zu eliminieren, andere Zellen wie reife T- Lymphozyten zu dezimieren und gleichzeitig Knochenmarksstammzellen in einem kleinen Volumen zu konzentrieren.

Grundsätzlich besteht bei der autologen Transplantation das Risiko, mit dem Transplantat wachstumsfähige Tumorzellen zu übertragen. dass dies von klinischer Bedeutung ist, konnte anhand von Studien gezeigt werden: Patienten, die Transplantate erhielten, bei denen im Kulturversuch Tumorzellen nachgewiesen waren, hatten ein deutlich erhöhtes Rezidivrisiko sowohl im Falle von soliden Tumoren (11,12), wie auch bei hämatologischen Tumoren (13-15).

1.2 Selektionsverfahren für Knochenmarkstransplantate

Die Knochenmarksaufbereitung ist in Form der Positiv- und der Negativselektion möglich. Die Negativselektion ist seit den 80-er Jahren fester Bestandteil der Knochenmarkstransplantation, während die Verfahren zur Positivselektion von Blutstammzellen erst in diesen Jahren entwickelt wurden.

1.2.1 Behandlung von Knochenmarkstransplantaten durch Negativselektion

Als Negativselektion gilt sowohl die Reinigung des autologen Knochenmarks-Transplantats von verbliebenen Tumorzellen, wie auch die Entfernung natürlicher Zellpopulationen, wie die der B- und T- Lymphozyten aus dem allogenen KM Transplantat. Seit den 80-er Jahren ist die Reduktion der Lymphozytenpopulation Standard in der allogenen Knochenmarkstransplantation (13).

Hierbei kam hauptsächlich das Verfahren durch Lektin Agglutination zur Anwendung:

Die leukozytenreiche Fraktion aus einer großen Menge Spenderknochenmark wird initial mit Sojabohnen- Agglutinin inkubiert, was zur Agglutination von T-Lymphozyten und anderer reifer Knochenmarkselemente führt, anschließend erfolgt die Rosettierung mit Schafserythrozyten (14)

Das Verfahren ist arbeitsaufwendig, störungsanfällig und schwierig zu standardisieren.

Ebenfalls als Negativselektion ist in diesem Zusammenhang die Behandlung des Transplantats mit verschiedenen Reagenzien, wie Chemotherapeutika, monoklonale Antikörper oder Immunotoxinen zu nennen.
Alle diese Verfahren sind zeit- und kostenaufwendig und führen in vielen Fällen zur Schädigung der hämatopoetischen Stammzellpopulation. Erfolgversprechender erschien die Positiv- Selektion der Blutstammzellen des Knochenmarkstransplantats.

1.2.2 Verfahren der Positivselektion von Knochenmarks- Stammzellen und peripheren Stammzellen

Wegen der genannten Risiken der Rezidivinduktion durch wachstumsfähige Resttumorzellen sowie des Risikos der Induktion von Graft-versus-Host-Disease (GvHD) wird versucht, die hämatopoetischen Stammzellen zu konzentrieren und den Anteil der Resttumorzellen zu vermindern.

Immunoadsorbtion durch Antigen- Antikörperbindung am CD34 Epitop

Alle im folgenden Abschnitt besprochenen Verfahren der Zellselektion beruhen auf dem Prinzip der Immunoadsorbtion: Antikörper welche gegen ein Zielepitop auf der Zelloberfläche einer Targetzellpopulation gerichtet sind, führen zur Anheftung des Antikörpers an die Targetzelle. In allen genannten Verfahren kommt Antikörper zu Anwendung welche gegen das CD34 Epitop auf hämatopoetischen Stammzellen gerichtet sind.
Die Antikörper erkennen das CD34 115.000 Dalton Glykoprotein welches sich auf 1 – 3% der humanen Knochenmarkszellen, einschließlich unreifer Blasten findet. Das Antigen fehlt auf reifen Knochenmarkszellen wie Lymphozyten, Granulozyten, Erythrozyten, oder Thrombozyten. CD34 positiv sind nahezu alle unreifen hämatopoetischen Zellen wie Granulozyten- Makrophagen- Vorstufen und Erythrozyten-Vorstufen sowie noch unreifere Zellen der Hämatopoese. (16)
Es konnte gezeigt werden, dass maligne Zellen aus der Mehrzahl hämatologischer wie auch solider Tumoren nicht mit Anti- CD34 Antikörpern reagieren. Da bestimmte Anti- CD34 Antikörper mit Tumorzellen reagieren (wie z.B. 12.8 Antikörper mit Lungentumoren und Leukämien (16)) ist die Auswahl des Antikörpers für ein Zellselektionsverfahren von großer Bedeutung. Insgesamt sind CD34 Antikörper für die Zellselektion geeignet.
Folgende Verfahren der Zellselektion haben eine breite Verwendung im experimentellen Bereich sowie in der klinischen Anwendung erfahren.

Immunomagnetische Verfahren

1.2.2.1 Zellselektion durch Dynalbeads® (Isolex 300i®)

Dynalbeads zur Negativ- und Positivselektion von Zellpools

Seit Mitte der 80er Jahre findet das von Dynal (Trondheim, Norwegen) entwickelte Verfahren breite Anwendung im Bereich des Tumorzell- Purgings, der HLA Typisierung und der Zellselektion. Kommerziell vertrieben für die Anwendung an Transplantaten wird es derzeit von Baxter als Isolex 300i.

Verwendet werden Polystyren- Kügelchen mit einem Durchmesser von 0,45 nm, welche 20% Magnetid enthalten. Auf der Feststoffmatrix der Kügelchen werden anti-CD34 monoklonale Antikörper gegen CD34 positive Vorläuferzellen immobilisiert. Die Beads bieten den Vorteil einer relativ großen Adsorptionsoberfläche bei geringen Volumina.

Das Verfahren ist mit einer Vielzahl von Antikörpern erprobt und durchgeführt worden und wurde im Laufe seiner experimentellen und klinischen Anwendung mehrfach modifiziert und weiterentwickelt.

Wegen der Ähnlichkeit zu dem in der vorliegenden Arbeit behandelten Verfahren soll die Dynalbead Methode hier kurz beschrieben werden (siehe dazu auch (15) und (17)).

Die immunomagnetische Selektion durch Dynalbeads ist in form der indirekten und der direkten Positivselektion möglich:

Die *indirekte* Positivselektion (20) besteht aus 3 Schritten:

1. Inkubation des Zellpools mit Antikörper
2. Rosettierung von Targetzellen an den Beads
3. Ablösung der selektierten Zellen von den Beads durch Chymopapain.

Im ersten Schritt wird die gewaschene buffy coat Fraktion mit 9C5 anti-DC34 monoklonalem Antikörper inkubiert (siehe Landsdorp et al (18)). Anschließend wird der überschüssige Antikörper durch Waschschritte entfernt. Jetzt werden die vorgewaschenen Beads mit der Zellsuspension in der Kammer inkubiert und damit rosettiert.

Die Kammer wird für 2 Minuten dem magnetischen Feld eines Dauermagneten ausgesetzt und zeitgleich die nicht adhärenten Zellen aus der Kammer ausgewaschen.
Im dritten Schritt werden die Zellrosetten Chymopapain ausgesetzt, welches die Bindungsepitope des CD34 Antigens auf der Zelloberfläche zerstört. Dadurch werden die Zellen von den Beads gelöst und können aus der Kammer ausgewaschen werden.
Es versteht sich, dass auf der Zelloberfläche nun bestimmte Chymopapain- sensitive Epitope fehlen. Dennoch können die Zellen anhand des 8G12 anti-CD34 Antikörpers weiterhin typisiert werden.
Bei einer anschließenden Inkubation der Zellen in einem 37° C warmen Medium werden die zerstörten Epitope wieder neu exprimiert.
Der Anreicherungsfaktor für CD34-positive Zellen bewegt sich bei 54-fach (+/- 5-fach) für adulte Blutstammzellen und 169-fach (+/- 17-fach) für Nabelschnurblut.
Die Recovery der CD34-positiven Zellen lag im Durchschnitt bei 34,9% (+/- 2,5%) bzw. 63,6% (+/- 6,6%) (19).
Die durchschnittliche Reinheit der CD34-positiven Zellen betrug 83% (Extreme von 48% bis 99%) (15). Die hämatopoetische Rekonstitution, gemessen als Leukozytenzahl von 1000/µl und Thrombozytenzahl von 50.000/µl war im Durchschnitt nach 36 Tagen bzw. nach 41 Tagen erreicht. Das entspricht der Rekonstitutionszeit, welche mit unselektierten Knochenmarkspräparaten erreicht wurde, allerdings bei deutlich höherer GvHD- Wahrscheinlichkeit.

Die *direkte* Immunomagnetische Positivselektion
Im Unterschied zum im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Verfahren wird hier der monoklonale anti- CD34 Antikörper mit den Beads gekoppelt und im Anschluss die buffy coat Fraktion mit den Antikörper- beladenen Beads inkubiert. Im Magnetfeld werden nun die Nicht- Targetzellen auspipettiert. Im Anschluss daran werden die Rosetten mehrere Male gewaschen.
Für den Ablösevorgang wurden anti- Maus- Fab Antikörper unter dem Namen Detach-a-beat® (Dynal) entwickelt (21). Diese Antikörper werden für 45 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur mit den Rosetten inkubiert. Die Anlagerung des polyklonalen Antikörpers an den Bead- Targetzell- Komplex führt zu einer sterischen Umstellung im monoklonalen Antikörper und zur Lockerung des Antigen- Antikörperkomplexes mit anschliessender Ablösung der Targetzellen. Die Beads werden dann im Magnet-

feld gesammelt und die Targetzellfraktion abgesaugt. Bei einer Ausbeute von 1,5% der buffy coat Fraktion ergibt sich eine Recovery von 64% der gewünschten Targetzellen.

Die Klinische Anwendung des Isolex 300i® beschreibt eine Studie aus dem Jahre 2000 an 20 Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie. Angezüchtete Stammzellen aus dem peripheren Blut wurden in Doppeldepletion mit Anti- CD34 beladenen immunomagnetischen Beads positiv und im Anschluss mit Anti- CD19/20/23/37 beladenen Beads negativ selektiert. Die gereinigten PBSC wurden nach myeloablativer Therapie reinfundiert. Es ergab sich eine Recovery von 33% CD34+ Zellen mit einer Reinheit von 98,8%. In 15 von 25 Endprodukten konnte mittels high resolution flow cytometry keine Tumorzellen mehr gefunden werden. Die mittlere Tumorzell- Reinigung (median purging efficacy) war log 5 (4,1 - 6). Bei 20 Transplantaten war die CD34+ Zellzahl 4,6 (2,2-6,6) x 10^6 /kg. Alle Patienten zeigten eine rasche hämatopoetische Rekonstitution. Nach einer mittleren Follow- up Zeit von 20 Monaten (6-29) lebten 17 Patienten in kompletter Remission (22).
In einer klinischen Studie aus dem Jahr 1998 werden an 18 Patienten mit Multiplem Myelom nach Mobilisation PBSC durch Leukapherese gewonnen. Bei einer mittleren mononukleären Zellzahl von 3,5 x 10^{10} war nach einem $CD34^+$ Selektionsdurchgang der Median der Recovery 48% (17% bis 78%) bei einer Reinheit (Median) von 90% (29-99%). Die Depletion von CD19+ in der flow cytometrie lag bei log 3,0. Die IgH-Gen PCR war negativ in 13/24 Fällen nach Selektion (bei nur 18 Patienten). Es kam es zur raschen hämatopoetischen Rekonstitution (Mediane Rekonstitutionszeiten: Granulozytenzahl >0,5 x 10^9 am 11. Tag, Thrombozytenzahl >20 x 10^9 am 14. Tag) (23).
Eine präklinische Studie aus dem Jahr 2001 gab für die Doppeldepletion mit Baxter Isolex 300i® bei drei Leukapheresen eine Recovery von 51% und eine Reinheit von 98% sowie eine Tumorzelldepletion von log 3,7 an (24).

1.2.2.2 Positivselektion mit paramagnetischen Nanobeads:

Von Miltenyi et al. (25) wurde ein weiterer magnetischer Zellseparator entwickelt. Dieses Verfahren ist die zurzeit in Deutschland gebräuchlichste Methode der Zellselektion.
Hier werden anstelle der in vorangegangenen Abschnitt beschriebenen relativ grossen Beads als Feststoffphase paramagnetische Nanobeads von 60 nm Durchmesser verwendet. Die Inkubation der Knochenmarkssuspension bzw. der Leukapheresen erfolgt wie in der indirekten Methode unter Dynalbeads beschrieben, in diesem Fall mit Q-BEND 10 anti-CD34 monoklonalem Antikörper. Anschließend erfolgen Waschschritte und dann die Durchmischung mit den Mikropartikeln. Die Bindung erfolgt aufgrund der Affinität der Eisen- Dextran-Mikropartikel zum Antikörper.
Die geringe Größe und die damit verbunden schwachen Kräfte im Magnetfeld erfordern die Verwendung eines magnetischen Hochintensitätsfeldes. Ein gewöhnlicher Dauermagnet wäre hier zu schwach.
Stattdessen wird das Feld in einer Säule erzeugt, welche mit magnetischen Partikeln gefüllt ist, gespeist von Magneten aus seltenen Erden.
Die magnetischen Partikel ziehen die Zellrosetten an und immobilisieren sie, während die nicht- Targetzellen die Säule durchfließen. Die Targetzellen werden nach Entfernen des Magnetfeldes aus der Säule eluiert. Als wichtiger Unterschied zu allen anderen Verfahren verbleiben hier die Partikel an den Targetzellen. Dieser Umstand scheint jedoch keinen Einfluss auf die Zellfunktion bzw. die flow-zytometrische Analyse zu haben. Die bisher vorliegenden klinischen Ergebnisse zeigen, dass die Beads keinen negativen Einfluss auf die Einnistung der Zellen in den Markräumen bzw. die hämatopoetische Rekonstitution haben (40 - 43). Laut der Aussagen von Shpall et al. (26) sind die Beads biologisch abbaubar.
Vorklinische Studien haben eine Reinheit der CD34-Fraktion von 93% ergeben. Ein wichtiger Vorteil des Verfahrens scheint die niedrige unspezifische Bindung zu sein, die auch die Verarbeitung von unreinem Knochenmark erlaubt.

1.2.2.3 Das Immunoadhärenzverfahren

Applied Immun Science Inc. Santa Clara, CA produziert und vermarktet den CEL-Lector ®. Dieser besteht aus Polystyrenoberflächen, an die Sojabohnen Agglutinin oder ICH3 monoklonaler anti-CD34 Antikörper kovalent gebunden ist. Als Feststoffphase dienen Zellkulturflaschen oder geschichtete Blätter in einer Laborschale (27).
Die Verarbeitung erfolgt in zwei Schritten:
Im ersten Schritt wird das Mark mit Sojabohnen- Agglutinin inkubiert, um den hauptsächlichen Anteil der nicht-CD34- Zellen zu entfernen. Für die weiteren Ansätze steht nun eine Suspension ohne B- Zellen, Erythrozyten, Fettzellen, T- Zellen und Tumorzellen zur Verfügung. Im zweiten Schritt werden die mit anti- CD34 monoklonalem Antikörper beschichteten Kulturflaschen mit der durch Sojabohnen Agglutinin depletierten Zellfraktion für 60 Minuten inkubiert.
Nach mehrfachem Spülen wird die CD34+ Zellsuspension durch Schütteln von der Oberfläche gelöst und durch Zentrifugieren konzentriert. Präklinische Studien haben eine Recovery von 30% und eine Reinheit von 74% ergeben.

1.2.2.4 Das Verfahren der Immunoadsorption

Die Immunoadsorption CD34-positiver Zellen wurde von CellPro Inc., Bothel, WA entwickelt und für die klinische Anwendung eingeführt. Aus patentrechtlichen Gründen ist es nicht mehr im Handel.
Bei diesem Verfahren wird das Zellgemisch mit dem biotinylierten monoklonalen Antikörper 12.8 inkubiert. Der Antikörper wurde von Andrew et al. (28) entwickelt. Die Zellsuspension wird anschließend durch eine Säule mit Avidin- beschichteten Polyacrylamid- Kügelchen geleitet. Die Antikörper- beladenen Zellen werden an den Beads immobilisiert während die CD34- freie Fraktion durch die Säule gewaschen wird. Nach Spülschritten werden die gebundenen CD34-positiven Zellen durch einen Magnetrührer von den Beads gelöst.
Nachdem vorklinische Studien für die hämatopoetischen Zellen eine Reinheit von 75% (50%- 91%) ergeben hatten (26) ist das Verfahren seit 1992 in einer Vielzahl von klinischen Untersuchungen eingesetzt worden. Es ist bisher genutzt worden für die Isolierung von CD34+ Zellen aus Knochenmark, Nabelschnurblut und peripheren

Blutstammzellen (29). Die hämatopoetische Rekonstitution entsprach der von unselektiertem Knochenmark.
In einer klinischen Studie aus dem Jahr 2000 wurde an 23 Patienten mit Multiplem Myelom nach Chemotherapie und anschließender PBSC Mobilisierung eine Positiv-Selektion mittels der Avidin-Biotin-Säule durchgeführt. Nach myeloablativer Therapie erfolgte die Transplantation. 16 Patienten erhielten unselektierte Zellen.
In der Flow- Cytometrie wurde eine Reduktion von log 2 Plasmazellen in der ersten Gruppe gemessen. Bezüglich der hämatologischen Rekonstitution, der Transfusionsnotwendigkeit sowie der klinischen Komplikationen wurden keine Differenzen zwischen den beiden Gruppen gefunden. Nach 3 und 18 Monaten Follow-up konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich kompletter (7/23 vs. 4/16) und partieller (10/23 vs. 5/10) Remission gefunden werden (30).
Die Säule kommt weiter zur Anwendung in der T- Zell Depletion in der allogenen Knochenmarkstransplantation mit dem Ziel, die GvHD Häufigkeit und Schwere zu reduzieren (31).
In Gentransferuntersuchungen mit dem Neomycin- Resistenz- Gen wird die Säule zur CD34+ Anreicherung von Knochenmarks- und PBPC- Präparaten bei der Transplantation von Patienten mit Mamma Ca, chronisch myeloischer Leukämie und multiplem Myelom verwandt (32,33).
In einer Studie aus dem Jahr 1999 war an 36 Patienten mit multiplem Myelom die Fähigkeit der Säule geprüft worden PBSC Transplantate mittels CD34+ Selektion von residuellen Tumor zu reinigen. 20 Patienten erhielten nach myeloablativer Therapie selektierte PBSCs, 16 Patienten wurden mit unselektierten PBSC transplantiert. Die Evaluation erfolgte mittels IgA- Gen Fingerprinting. Die ex vivo angezüchtete PBSCs waren in der PCR positiv in 13/20 Fällen. Nach Selektion verblieben 7/20 positiv. Bezüglich des Outcome gemessen in rezidivfreiem Überleben konnten keine Unterschiede zwischen den Behandlungsarmen gefunden werden (34).

1.2.2.5 Die Flowzytometrie

Dieses Verfahren kommt seit vielen Jahren für die immunologische Typisierung von Zellen zur Anwendung. In Form des "Cell Sorting" können simultan mehrere Subpopulationen von CD34+ Zellen hochselektiv isoliert werden.

Bei der Anwendung an großen Proben, wie sie zur Transplantation zum Einsatz kommen, entstehen bei der Flowzytometrie eine Reihe von Schwierigkeiten, die den klinischen Einsatz erschweren.

Die übliche Flowzytometrie sortiert mit einer Geschwindigkeit von 5 - 10 x 10^3 Zellen/Sekunde. Für die klinische Anwendung ergäben sich daraus eine unrealistische Präparationszeit sowie Probleme mit der Sterilität der Proben.

Systemix in Palo Alto, CA hat ein Verfahren entwickelt, wobei die Probe nach einer Reihe von Anreicherungsschritten eine Hochgeschwindigkeits- Flowzytometrie durchläuft, die den Präparationsvorgang auf weniger als 6 Stunden verkürzt. Ein Vorteil des Verfahrens ist die Differenzierung von $CD34^+$ Subpopulationen, was die Selektion von hochreinen $CD34^+$ Lineage - negativen Zellen ermöglicht. Angesichts der CD34 Expression von 40 - 60% auf Zellen akuter und chronischer Leukämie ist dies ein Vorteil, welchem keine andere Methode gleichkommt. Vorklinische Studien mit dem Cell Sorting haben eine Myelomzelldepletion von 6-7 log aus dem Knochenmark sowie dem peripheren Blut ergeben (35).

In einer im Jahr 2000 veröffentlichten klinischen Studie an 31 Patienten mit Multiplem Myelom konnten 23 Transplantationen durchgeführt werden. Über einer Schwellendosis von 0,8 x 10^6 $CD34^+Thy1^+$ hämatopoetischen Stammzellen / kg Körpergewicht kam es zur raschen hämatopoetischen Rekonstitution (Mittlere Rekonstitutionszeiten: Granulozytenzahl >0,5 x 10^9 am 10. Tag, Thrombozytenzahl >50 x 10^9 am 13. Tag). Die Tumorzellreduktion lag bei mehr als 3 log. Die Infektionsrate in der Frühphase lag jedoch deutlich höher als sonst üblich bei der selektierten und unselektierten KMT (36).

Die Hochgeschwindigkeits- Flowzytometrie ist aufwendiger und störungsanfälliger als die übrigen genannten Verfahren, so dass eine weite Verbreitung zur klinischen Anwendung momentan außerhalb hochspezialisierter Labore unrealistisch ist.

1.2.2.6 Nicht auf Zellselektion beruhende Transplantationsmethoden

Weitere Methoden der allogenen Knochenmarkstransplantation seien hier kurz erwähnt:

1. Retroviren- unterstützter Gentransfer für die Transduktion von Knochenmarkzellen, mit dem Ziel der Langzeitexpression von Genen in der Empfängerzelle (32). Die hiervon abgeleiteten Verfahren sind noch in Erprobung.
2. Die Verwendung von Nabelschnurblut zur Transplantation von Kindern. Wegen des frühen Reifungsstadiums der Zellen ist dadurch die Wahrscheinlichkeit GvHD Krankheit geringer. Die Inzidenz des Transplantatversagens ist – schon wegen der geringen Gesamtzellzahl - höher. Außerdem sind aufgrund der geringen Konzentration an hämatopoetischen Stammzellen relativ große Volumina erforderlich. Die Transplantation Erwachsener und größerer Kinder wäre daher nur nach ex-vivo Expansion des Zellpools denkbar (37,38).Auch davon abgeleitete Verfahren haben noch keine breite klinische Anwendung gefunden.

1.3 Polyacrolein- Microspheres als Vektor für die Zellselektion

Im Zuge der Entwicklung von Selektionsmethoden für zelluläre Blutbestandteile während der frühen 90er Jahre des letzten Jahrhunderts soll im Rahmen meiner Arbeit ein weiteres Verfahren für die Zellselektion untersucht werden.

Hintergrund und bisheriger Einsatz von Polyacrolein Microspheres

Shlomo Margel, Professor für Polymerchemie an der Universität von Ramad Gan in Israel, hat Mitte der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts ein Verfahren zur Polymerisation von Acrolein entwickelt, welches die Kondensation von Kunststoffkügelchen mit aktivierbarer Oberfläche erlaubt. Auf dieser Grundlage war es möglich, Proteine kovalent an die Polymeroberfläche der so entstandenen Microspheres zu binden. Die kovalente Bindung von Proteinen erlaubt es, monoklonale Antikörper auf der Oberfläche der Kügelchen zu immobilisieren. Diese Antikörper können ihrerseits spezifische Bindungen mit Antigenen eingehen. Befinden sich die Targetantigene

auf Zelloberflächen, ist daher mit Immunoadhärenz der betreffenden Zellgruppe zu rechnen.
Eine weitergehende Besprechung der chemischen Grundlagen folgt in Abschnitt Material und Methode.
Von der Arbeitsgruppe um S. Margel wurden Mitte der 80er Jahre im Tierexperiment Versuche durchgeführt, in denen die klinische Wirksamkeit im Bereich der Antikörper- und Immunkomplexextraktion aus peripherem Blut demonstriert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass sich das spezifisch gebundene Antigen mit großer Reinheit wiedergewinnen ließ und sich der Bindungsvektor Microsphere - Antikörper bei geringem Aktivitätsverlust für weitere Versuche regenerieren ließ (39,44).
Spätere Untersuchungen konnten eine wirksame Reinigung von Antikörpern aus menschlichem Vollblut mittels Hämoperfusion durch eine Säule mit Polyakrolein Beads in Silikonmatrix bei Patienten mit ITP (Immunthrombozytopenischer Purpura) zeigen (45,46). Die Nebenwirkungen des Verfahrens auf Blutzellen und Gerinnungsproteine waren dabei vertretbar gering (47).
Nach den ermutigenden Ergebnissen auf dem Gebiet der Antikörperbindung und -ablösung nach spezifischer Bindung an Polyacrolein- gebundene Antikörper gab es Anlass zur Hoffnung, dass zelluläre Bestandteile in ähnlicher Weise mit dem Vektor reagieren. Ein neues Verfahren zur Positiv- und Negativselektion von Targetzellen schien damit denkbar.

1.4 Fragestellung der Arbeit

Vor dem Hintergrund der im vorangegangenen Abschnitt genannten ermutigenden Ergebnisse war es die Aufgabe meiner Arbeit zu prüfen, ob sich das Verfahren in ähnlicher Weise für die spezifische Bindung von Zellen und damit für die Selektion von Blutzellen heranziehen lässt.

a) *Da unter der genannten Fragestellung noch keine Experimente durchgeführt worden waren, sollten zuerst eine Reihe technischer Fragen beantwortet werden:*

- Welche Bedingungen sollten für die Präparation des mononukleären Zellpools eingehalten werden. Auf welche Zellzahl soll die Suspension für den Separationsprozess eingestellt werden

- In welcher Weise sind die Kapillaren vorzubereiten bezüglich Antikörperkonzentration, Einwirkdauer der Antikörpersuspension, Blockierung überschüssiger Bindungsvalenzen.
- Unter welchen Bedingungen ist die bestmögliche Zellbindung zu erreichen, insbesondere welche Inkubationsdauer, welche Lagerungsform der Kapillaren und welche Form der Durchmischung sind einzuhalten.
- Auf welche Weise können sterile Kautelen eingehalten werden
- In welchem Zeitrahmen lässt sich der Selektionsvorgang durchführen
- Wie lassen sich adhärente Zellen möglichst vollständig und unter möglichst zellschonenden Bedingungen wieder ablösen.

b) *Vor dem Hintergrund der in der Literaturbesprechung genannten Verfahren und damit verbundenen Qualitätsmerkmalen für die Zellselektion sollen folgende Fragen geklärt werden:*

- Wie spezifisch bindet das Verfahren Targetzellen
- Wie ist die Viabilität der angelagerten und wieder abgelösten Zellen.
- Welche Recovery ist mit dem Verfahren zu erreichen
- Wie hoch ist die Reinheit ist für das gewonnene Produkt

1.5 Datenerhebung und Wiedergabe in der Arbeit

Der überwiegende Teil der Arbeit befasst sich mit den unter 1.4.a) formulierten Fragen. Die Beobachtungen aus den durchgeführten Versuchen werden meist in semi-quantitativer Form protokolliert und in der Arbeit wiedergegeben.
Die Beantwortung der unter 1.4.b) genannten Fragen sowie der Vergleich mit den in der Einleitung besprochenen Verfahren erforderte quantitative Ergebnisse. Diese konnten erst am Ende der Arbeit gewonnen werden.

2. Material und Methode

Material

2.1. Polyacrolein Microspheres

Polymerische Microspheres auf der Basis von Methyl (Hydroxymethyl) acrylate wurden entwickelt und eingeführt von S. Margel Professor für Polymerchemie an der Bar-Ilan Universität in Ramat-Gan, Israel.

2.1.1 Herstellungsprozess

Polyacrolein Microspheres sind ein Produkt aus der Reaktion von Methylacrylat mit Paraformaldehyd. Durch wässrige Polymerisation des Monomers unter Anwesenheit von Polyvenylalkohol lassen sich Teilchengrössen von 0,4 µm bis 2,7µm erzeugen - Polyacrolein Microspheres (48). Die von uns eingesetzten bewegen sich in einem Bereich von 0,7 µm Durchmesser.
Die Oberfläche dieser Microspheres läßt sich für die Bindung von z.B. Proteinen aktivieren, indem aktive Aldehydgruppen freigelegt werden. Dafür steht eine Reihe von Verfahren zur Verfügung, wobei die von uns verwendeten mit 4 - nitrophenyl chlorophormat aktiviert wurden (49). Proteine lassen sich dann kovalent in Form einer Schiff'schen Base an Microspheres binden, wobei die Bindungskapazität zwischen 50 - 80 µg per mg Microspheres liegt (49).
Auf demselben Weg - einer kovalenten Bindung - lassen sich aktivierte Microspheres an Amingruppen tragenden Oberflächen immobilisieren. Die von mir verwendeten Microspheres waren kovalent an die Oberfläche von Glaskapillaren gebunden und wurden von Margel in bereits gebrauchsfertiger Form zur Verfügung gestellt.
Der Herstellungsprozeß dieser Mikrosphere- Kapillaren umfasste die kovalente Bindung von kurz- und langkettigen (w)-zyanoalkylsilan Bestandteilen auf der Glasoberfläche. Die Nitrilgruppen an der (w)- Position wurden dann reduziert zu primären Aminogruppen. Polyacrolein Microspheres mit einem Durchmesser von 0,7 µm wurden dann an die aktivierte Oberfläche gebunden (50). Die Glaskapillaren vom Durchmesser 1 mm und einer Länge von ca. 12 cm mit den angelagerten Microspheres können zur Aufbewahrung entweder trocken oder in Kochsalzlösung gelagert werden.

In unserem Fall war das Lagerungsmedium Kochsalz, welches mit 0,01% Merthiolate (Sigma) zum Schutz vor Pilzbefall versetzt war. Da Aktivitätsverluste bei längerer Lagerung (> 1 Monat) auftreten und das Versuchsergebnis beeinflussen können (49), musste auf eine rasche Aufeinanderfolge der Versuche geachtet werden.
Um überschüssige Bindungskapazitäten an den aktivierten Microspheres zu eliminieren, müssen die Kapillaren nach Inkubation in Antikörperlösung mit boviner Serumalbumin (BSA)- Lösung geblockt werden, um kein weiteres Protein (z.B. Membranproteine von Zellen) mehr unspezifisch binden zu können.

2.1.2 Charakteristika der verwendeten Kapillaren

Aus den unter 2.1.1 beschriebenen Herstellungsschritten der Microspheres Kapillaren geht eine Reihe von Zwischenprodukten auf dem Weg zur fertigen Microspheres beladenen Kapillare hervor, die das Bindungsverhalten sowohl für Antikörper als auch für Targetzellen beeinflussen kann: So ist bekannt, dass Glasoberflächen die Fähigkeit besitzen Proteine anzulagern, was ohne Zweifel auch auf Antikörper zutrifft. Die Frage der Anlagerung von Protein und Zellen im Sinne einer unspezifischen Bindung wird in mehreren der Experimente ausführlich abgehandelt.
Weiter ist Anlagerung von Proteinen und Zellwandbestandteilen von Zellen an die aktivierten Amingruppen auf den Glaskapillaren und den Microspheres als möglicher Störfaktor anzunehmen. Es werden daher als Kontrollgruppe Kapillaren mitgeführt, die auf ihrer Oberfläche aktivierte Amingruppen tragen.
Microspheres- Kapillaren dienten mir als Positivkontrolle, während die Zwischenprodukte der oben beschriebenen Herstellung (Glaskapillare und Aminkapillaren) als Negativkontrolle mitgeführt wurden. Erste Versuche wurden so mit 3 verschiedenen Kapillartypen durchgeführt:

1. unbehandelte Glaskapillaren	Gls
2. Kapillaren mit aktivierten Amingruppen,	Amn
3. Microspheres- Kapillaren	Mic

Nachdem bereits ein Teil der Experimente durchgeführt war, erhielten wir von Margel zusätzlich präparierte Proben: Darin waren die überschüssigen Bindungsarme der aktivierten Amingruppen durch einen mir nicht näher bekannten Prozeß blockiert worden - im Falle von Aminkapillaren unmittelbar nach der Aktivierung, im Falle von Microspheres Kapillaren (die Blockierung der überschüssigen Bindungsarme) nach Bindung der Microspheres. Eine mögliche Wechselwirkung der aktivierten Amingruppen mit Zellwandbestandteilen von Targetzellen ließ sich damit ausschließen. In der Mehrzahl der Versuche standen so 5 Gruppen von Kapillaren zur Verfügung:

1. unbehandelte Glaskapillaren	Gls
2. Kapillaren mit aktivierten Amingruppen	Amn
3. Kapillaren mit blockierten Amingruppen	bAmn
4. Microspheres Kapillaren	Mic
5. Microspheres Kapillaren mit blockierten Amingruppen	bMic

2.2 Antikörperwahl

Folgende Antikörper kamen in den Versuchen zur Anwendung, ihre Eigenschaften werden im Anschluss besprochen:

1. Bei der überwiegenden Zahl der Versuche dient Campath-1-(Welcome) in Form von IgG und in Form von IgM Antikörper als Bindungsvector für Targetzellen. Campath-1-(Welcome) ist ein seit 1986 kommerziell produzierter Antikörper mit spezifischer Bindungsfähigkeit für B- und T- Lymphozyten sowie für Monozyten (51). Er besitzt als zytotoxischer Antikörper Komplement -Bindungsfähigkeit und führt bei Konzentrationen von 10 µg/ml und Anwesenheit von 10-20% Plasma zur Lyse der Targetzelle. Seine Bindungseigenschaften begründen seine weite Verbreitung zur T-Zell- und Tumorzell- Depletion in der Knochenmarks- Transplantation (52). Seine bekanntermaßen starke Bindungsfähigkeit, sowie die Verfügbarkeit des Antikörpers im Labor ließen ihn für unsere Versuche geeignet erscheinen.

2. Für Vergleichsuntersuchungen haben wir einen „hauseigenen“ Antikörper W 6/32 herangezogen.
   Bei dem Antikörper W6/32 handelt es sich um einen Maus HLA Klasse I Antihuman Antikörper der im Hause produziert wurde und für die Versuche gereinigt und aufbereitet zur Verfügung stand. Der Antikörper richtet sich gegen humane Leukozyten. Das Ziel- Antigen scheint hier eine Determinante auf den 43kD Polypepdidprodukten der HLA A, B und C Loci zu sein (53).

3. Die abschließenden Untersuchungen zu Spezifität der Bindung verwenden anti-B-Zell Antikörper. Verwendet wurde ein monoklonaler Maus Antihuman Antikörper der sich gegen das 35 kD CD 20 Phosphoprotein Antigen richtet und zur Immuntypisierung herangezogen wird. Er steht kommerziell in gefriergetrockneter Form zur Verfügung (Dianova, Hamburg; Kat. Nr. 0549). Er bindet selektiv an B- Zellen sowie an non-T Lymphomzellen.

4. Zur Fluoreszenzmarkierung von gebundenen Antikörpern diente GAM-FITC heterologer Ziegen Anti- Maus Antikörper mit Fluoreszein- Markierung von Coulter Clone (Coulter Electronics, Krefeld). Er richtet sich gegen leichte und schwere Ketten von Maus IgG und IgM und dient nach Anlagerung von Campath AK der Visualisierung der gebundenen Antikörper.

2.3 Übrige Gebrauchslösungen

Bereits früh während der Vorversuche wurde PBS als Lösung für die Herstellung von Zellsuspensionen durch 1% BSA in PBS ersetzt. Als Ausgangsmaterial diente gefriergetrocknetes BSA (Sigma Diagnostics, Poole, UK). Es erfolgte der Ansatz einer 5%-igen Stammlösung in 50 ml Laborröhrchen. Die Stammlösung wurde zum Gebrauch um den Faktor 10 mit PBS verdünnt.

Für die Vitalfärbung wurde Ethidiumbromid/Acridinorange eingesetzt.
Hierzu wurde eine Stammlösung mit 15 mg Acridinorange (Fa. Aldrich-Chemie) in 1ml Ethanol gelöst und mit PBS ad 50ml verdünnt.

Die gewonnene Stammlösung wurde vor Gebrauch mit PBS im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die Konzentration der Gebrauchslösung entsprach daher ~ 0,03mg/ml Acridinorange.
Zum Ansatz der Ethidiumbromid- Stammlösung wurden 50 mg Ethidiumbromid (Fa. Aldrich-Chemie, Seelze) in 1ml Ethanol gelöst und ebenfalls mit PBS ad 50 ml verdünnt. Für die Gebrauchslösung erfolgte erneute Verdünnung mit PBS im Verhältnis 1:40.
Die Gebrauchslösung von Ethidiumbromid/ Acridinorange wurden durch Mischung der beiden Gebrauchslösungen im Verhältnis 1:1 gewonnen, was einer Konzentration von Acridinorange 0,016 mg/ml und Ethidiumbromid 0,0125 mg/ml entsprach

2.4 Vorversuche mit Zellen

Zunächst wurde eine Anzahl von Vorversuchen durchgeführt, um das grundsätzliche Handling mit den Kapillaren zu erproben und ihr Bindungsverhalten kennenzulernen.
Die Versuche variieren im Versuchsaufbau deutlich, sodass eine detaillierte Beschreibung der Versuche im Einzelnen erforderlich ist. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Einzelversuche in einen Anhang ausgegliedert. Die folgenden Abschnitte beschreiben die Entwicklung der Methoden.

Vorbereitung der Kapillaren

Die oben beschriebenen Kapillartypen wurden nach Spülung in physiologische Kochsalzlösung mit Campath IgM der Konzentration 25µg/ml und Campath IgM der Konzentration 50µg/ml inkubiert. Dies erfolgte bei 4° C für 14h im Überkopfschüttler in 2,5ml Laborröhrchen. Nach anschließendem dreifachem Spülen wurden die Kapillaren für 2-4 Stunden bei Zimmertemperatur in Proteinlösung inkubiert. Hierfür war ein Ansatz von 0,1% BSA in PBS Lösung vorbereitet worden. Der Inkubationsschritt diente der Blockierung von überschüssigen freien Bindungsvalenzen. In späteren Versuchen wurde mit einer konzentrierteren Blockungslösung von 0,5% BSA und einer verlängerten Inkubationszeit von 14h gearbeitet.

Präparation mononukleärer Zellen

Die Zellsuspension zur Inkubation der Kapillaren wurde aus Vollblut sowie aus Buffy Coat Fraktion einer getesteten Blutspende präpariert.
Die dabei verwendeten Mengen lagen bei 2,0 bis 2,2 ml EDTA Blut (Saarstedt Monovetten). Die mononukleären Zellen wurden durch Dichte-Zentrifugation (Lymphoprep, Nycomed, Oslo) gewonnen.
Die Ursprungszellsuspension - Vollblut oder Buffy Coat Fraktion wurde im Verhältnis 1:2 mit einer PBS - Lösung ohne Calcium verdünnt (Gibco Inc. Grand Island, New York, USA). In 50 ml Laborröhrchen (Greiner Labortechnik, 72636 Frickenhausen) wurden 25 ml Lymphoprep (Nycomed) gegeben. Darauf wurde die vorbereitete Zellsuspension verwirbelungs- und damit durchmischungsfrei aufgetragen. Es erfolgte eine Zentrifugation mit 1800/min = 489 x g für 25 min bei schwacher Bremse in einer Heraeus Zentrifuge 4500 3,2 RS. Die nach Zentrifugation am Oberrand des Interfaces verbliebene Zellsuspension stellte die um Granulozyten und Erythrozyten depletierte mononukleäre Zellfraktion dar, die in der Folge als MNC oder Ficoll ® Fraktion bezeichnet wird.
Es folgte das Abpipettieren der mononukleären Zellenfraktion und Einbringen des Überstandes in 50 ml Laborröhrchen (Greiner Labortechnik). Anschließend wurden die Zellen mit PBS ohne Kalzium auf 50 ml aufgefüllt und für 10 Minuten bei 1800 U/min (489 x g) sedimentiert. Die Resuspension erfolgte mit 1 ml 0,5% bovinem Serum Albumin (BSA) in PBS o.Ca (Phosphate Buffered Saline ohne Kalzium). Die Zellzahl der Suspension wurde mit Hilfe automatisierter Zellzählung (Model T, Beckman/Coulter, Fullerton CA, USA) auf eine Konzentration von 1000 Zellen/µl eingestellt. Das Gesamtvolumen der Resuspension lag dann bei etwa 1- 2 ml.
Da die Volumina der mononukleären Zellfraktion aus 2,3 ml Saarstedt EDTA- Röhrchen nicht ausreichend Material boten, wurde im Verlauf der Versuche Buffycoatfraktion aus der Produktion von Blutprodukten eingesetzt. Dadurch war eine Erhöhung der Zellkonzentration ebenso wie eine Erhöhung der Volumina für die Inkubationslösungen möglich. Das Material wurde von der Produktionsabteilung der DRK Blutspendezentrale Ulm zur Verfügung gestellt. Hierdurch war die Herstellung von bis zu 40 ml MNC Fraktion mit Leukozytenkonzentrationen von 10.000 Zellen/ µl möglich. Der Zellsuspension wurde EDTA Lösung zu einer Endkonzentration von 5 mmol/l zugesetzt.

Inkubation der Glaskapillaren mit Zellen

Nach der Isolierung der mononukleären Zellen erfolgte die Inkubation von Kapillaren der Gruppen `Glas´, `Amin´ und `Microspheres´.
Zur Durchmischung wurde anfangs ein Überkopfschüttler GFL 3025 (GFL, Burgwedel) verwendet. In späteren Versuchen erfolgte die Inkubation mittels eines Taumelschüttlers Typ Reax 3 (Heidolf, Osterburgen) mit minimaler Drehzahl für eine Stunde.
Als Alternative zum Taumelschüttler für die Inkubation war zum Zwecke einer schonenderen Durchmischung der Bellydancer ® (Stovall Live Science Inc. Greensboro, USA) eingesetzt worden.
Im Verlaufe der Vorversuche wurde deutlich, dass während der Inkubation von Kapillaren in Laborröhrchen turbulente Strömungen entstehen. Die dadurch verursachten Kräfte entlang der Kapillaren können die Anlagerung von Zellmaterial stören. Mit dem Ziel, die Inkubation unter maximal laminarer Umspülung der Kapillaren zu erreichen, wurden ein Versuchsaufbau unter Zuhilfenahme einer Färbeküvette entwickelt.
Die Glaskapillaren werden wie oben beschrieben vorbereitet und zwischen zwei Objektträger eingespannt und auf den Boden der Küvette gelegt. Der Glasdeckel einer kleinen Färbeküvette wird aufrecht auf den oben liegenden Objektträger gestellt und mit Klammern am Rand der Küvette eingespannt. Objektträger wie Kapillaren sind so am Boden der Färbeküvette immobilisiert.

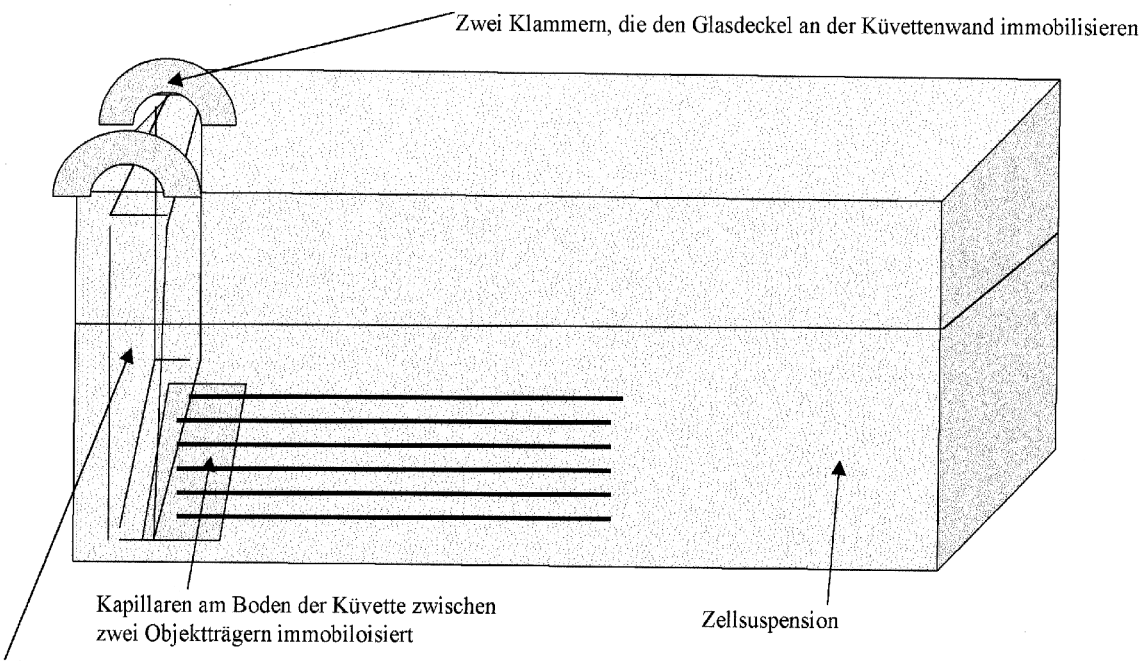


Abbildung 2 skizzert den Versuchsaufbau für die Inkubation von Kapillaren in der Färbe küvette. Zur Durchmischung wurde die Küvette auf dem Bellydancer ® bewegt. Die dadurch erzeugten Pendelbewegungen der Zellsuspension sorg ten für eine relativ laminare Umspülung der Kapillaren.

Auswertung

Die Kapillaren wurden anschließend entnommen und in drei Waschschritten in vorbereiteten PS- Röhrchen mit 0,5% BSA in PBS auf dem Überkopfschüttler bei niedriger Umdrehungszahl gewaschen.

Zur Darstellung der gebundenen Zellen wurden die Kapillaren anfangs auf einem Glasobjektträger abgerollt und nach Pappenheim gefärbt. Die Mikroskopie erfolgte mit dem Leitz Aristoplan Mikroskop mit Durchlicht. In der Mehrzahl der Versuche haben zwei Auswerter die Ergebnisse unabhängig voneinander beurteilt. Als Ergebnis wurde das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit von Zellen auf der Kapillare festgehalten.

Alternativ wurden die Kapillaren in eine wassergefüllte Petrischale gegeben und im Inversionsmikroskop unter Durchlicht im Phasenkontrast auf das Vorhandensein von Zellen hin mikroskopiert.

Die semiquantitative Wiedergabe der an die Kapillare angelagerten Zellzahl richtete sich nach den folgenden Auswertungskriterien:

„0“ : keine Zellen auf der Kapillare beobachtet
„0-+“: vereinzelte Zellen
„+“: vermehrte Zellzahl, einzelne Zellen jedoch deutlich abgrenzbar
„++“: z.T. dichter Zellrasen abwechselnd mit zellarmen Abschnitten
„+++“: dichter Zellrasen
Beurteilt wurde der Kapillarenanteil mit dem größten Zellbesatz.

Zur Ablösung der gebundenen Zellen erfolgte danach eine Zentrifugation der Kapillaren im Laborröhrchen für 10 Minuten mit 3000 U/min (815 x g). Nach Entnahme der Kapillaren wurde das Laborröhrchen auf ein Zellpellet am Röhrchenboden untersucht. Gegebenenfalls wurde dieses resuspendiert.
Weiter wurde versucht die gebundenen Zellen auf der Kapillare durch Rütteln bei 1000 U/min für 20 Minuten im Rüttler abzulösen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation und Sedimentierung der Zellsuspension. Fand sich am Boden des Röhrchens ein Zellpellet wurde dieses resuspendiert.
Alternativ wurden die Kapillaren zur Ablösung invertiert in das Laborröhrchen eingebracht und es erfolgte erneut die Zentrifugation mit 815 x g.
Als weitere Auswertungsmethode wurde die zellarme Ablösesuspension der Zytozentrifugation zugeführt: Hier wurde das Sediment im Laborröhrchen in geringem Volumen resuspendiert und bei 800 U/min (g x 217) 10 Minuten lang zentrifugiert. Der so entstanden Sedimentrasen wurde nach Pappenheim gefärbt.
Mit dem Ziel die Ablösung der Zellen von den Kapillaren zu verbessern wurden die Kapillaren nach Zentrifugation bei 543 x g in 0,2 mol/l Glycin bei pH3,5 gegeben. Der Ablöseversuch erfolgte für 5 min im Überkopfschüttler bei niedriger Umdrehungszahl gefolgt von Mikroskopie der Kapillaren nativ in der Petrischale unter dem Inversionsmikroskop.
Im Anschluss daran wurden die Kapillaren einem weiteren Ablöseschritt unterzogen: Unter gleichen Bedingungen wie für Glycin erfolgte die Einbringung in 1% Triton, gefolgt von erneuter Mikroskopie.

Im Verlauf der Experimente wurde anstelle der Pappenheim Färbung die Vitalfärbung mit Ethidiumbromid und Acridinorange angewandt: Die Methode ermöglichte die Färbung von Zellen in Suspension sowie von Zellen, welche an Kapillaren angelagert waren.
Die Auszählung der Zellzahl in Lösung erfolgte mittels Neubauer- Zählkammer. Dazu wurde das Zellpellet am Boden des Laborröhrchens in wenig Volumen 0,5% BSA resuspendiert und mit der Pipette eine geringe Menge Ethidiumbromid/ Acridinorange Gebrauchslösung zugegeben.

2.5 **Versuche zur Antikörperbindung**

Aufgrund des Verlaufs der Vorexperimente mit Zellen schien es notwendig, Klarheit über die Antikörperbindung der unterschiedlichen Kapillartypen zu erhalten. Es waren daher an dieser Stelle eine Reihe von Untersuchungen ohne Zellen nur mit Protein- und Antikörperlösungen durchgeführt worden.
Die angewandte Methode stützte sich auf die Visualisierung der gebundenen Antikörper auf der Grundlage von Fluoreszenz- Antikörpern.
Eingesetzt wurden Fluoreszenz- Antikörper vom Typ GAM-FITC heterologer Ziegen-anti- Maus Antikörper von Coulter Clone (Krefeld). Der Antikörper bindet verläßlich an Epitope auf der Fc Region von Campath monoklonalen Mausantikörpern. Nach pH Absenkung auf pH 3 ist die Bindung von GAM-FITC an das Campath Epitop qualitativ reversibel.
Sowohl Campath wie auch GAM FITC Antikörper wurden bei den Versuchen als Primär- wie auch Sekundärantikörper verwendet. Als Primärantikörper wurde jener Antikörper bezeichnet, welcher über die oben beschriebene Bildung einer Schiff´schen Base eine kovalente Verbindung mit den Microspheres eingeht. Als Sekundärantikörper jener, welcher über eine Antikörper- Antigen- Bindung an den Primärantikörper anlagert.
Als Laborgefäße dienten für alle Inkubationen und Waschvorgänge PE 2,5 ml Laborröhrchen (Greiner Labortechnik, Frickenhausen). Für die zur Inkubation sowie zur Ablösung notwendige Durchmischung sorgte ein Überkopfschüttler (GFL 3025, Burgwedel). Vor ihre Verwendung im Experiment wurden sie dreimal in PBS o. Ca. in Greiner Laborröhrchen 2,5ml gewaschen.

Die zu untersuchenden Kapillaren wurden für 14h bei 4° C im Überkopfschüttler mit unterschiedlichen Antikörper- Konzentration inkubiert. Nach anschließender dreimaliger Spülung mit PBS o. Ca. erfolgte die Blockierung der überschüssigen Bindungsvalenzen mit 0,5% BSA in PBS für 12h bei 20° C ebenfalls im Überkopfschüttler. Anschließend wurden die Kapillaren bei 4° C bei Dunkelheit zwischen 30 Min und 2 Stunden in Sekundärantikörper inkubiert. Hierbei waren die Kapillaren in 2,5 ml Laborröhrchen gelagert, indem sie mit dem Stopfen gegen die Wand des Laborröhrchens gedrückt wurden und somit immobilisiert waren. Dies sollte das Entstehen von Artefakte beim Gleiten im Laborröhrchen verhindern. Nach erneutem dreimaligen Spülen der Kapillare durch vorsichtiges Herausnehmen aus dem Laborröhrchen und Tauchen in 0,5% BSA in PBS wurden die Kapillaren in oben beschriebener Weise mikroskopiert und fotografiert.

Mittels pH- Modulation wurde die Bindung von Sekundär- an Primärantikörper auf ihren reversiblen Charakter untersucht. Nach Herstellung einer 0,2 molaren Glycin-Lösung wurde diese durch Titration mit HCl auf einen pH- Wert von 3 eingestellt. Kapillaren wurden wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben in Primär- Antikörper inkubiert und geblockt. Im Anschluss wurden sie nun für 5 Minuten bei vorsichtiger Durchmischung im Taumelschüttler in der pH3- Lösung inkubiert und danach dreimal in PBS o. Ca gespült.

Als Erfolgskontrolle haben zwei Auswerter das Fluoreszenzverhalten von inkubierten Kapillaren im Inversionsmikroskop (Typ 471703, Zeiss/ Oberkochen) in PBS gefüllten Petrischalen unter Blau- Fluoreszenz bzw. am Leitz Aristoplan unter Blau-Fluoreszenz und Durchlicht betrachtet.
Beurteilt wurden die Leuchtkraft und die flächenmäßige Verteilung der Fluoreszenz (wie im Falle der oben beschriebenen Untersuchung auf Zellbesatz) in semiquantitativer Form. Dabei haben wir uns nach folgenden Kriterien orientiert:

Beurteilungskriterien für die Fluoreszenzauswertung

1. Die ersten beiden Drittel der Kapillare wurden beurteilt, da nach Aussage von Prof. S. Margel, nur in diesem Bereich die chemische Behandlung der Glasoberfläche stattgefunden hat.
2. Nur klar demarkierte Fluoreszenz- Areale wurden mit „+“ bewertet, diffuses schwaches Leuchten bekam die Bewertung „0-+“.
2. Große Floureszenzareale mit starker Leuchtkraft wurden mit „++“ bewertet, ebenso eine große Zahl eng aneinandergrenzender kleiner Areale mit kräftigem Leuchten.
3. Stark fuoreszierende Areale, die zumindest teilweise die gesamte Zirkumferenz einnahmen, wurden mit „+++“ kodiert.

Weiter waren zur Befunddokumentation und Illustration Diapositiv- Fotografien angefertigt worden. Hierfür eingesetzt wurde das Leitz Aristoplan mit Floureszenzoption mit dem Leitz Orthomat E Fotozubehör. Die Belichtung der Dias erfolgte unter Mischbestrahlung mit Fluoreszenzlicht, erzeugt von einer Quecksilberdampflampe sowie gewöhnliches Durchlicht zur Visualisierung der Kapillarkontur. Belichtungszeiten schwankten je nach Leuchtkraft der Fluoreszenz bzw. der Stärke des Durchlichtes zwischen 10 und 90 Sekunden.

Der folgende Abschnitt beschreibt die allgemeine Vorgehensweise bei den Vorversuchen zur Proteinbindung. Die Einzelexperimente sind wie im Falle der Vorversuche mit Zellen in den Anhang ausgegliedert.

2.6 Versuche zur Anlagerung und Ablösung von Zellen

Wie bereits im Abschnitt Vorversuche ausgeführt, war das Verfahren zur Inkubation von Zellsuspensionen mehrfach variiert worden. Zuletzt wurden die Kapillaren während der Inkubation zwischen 2 Objektträgern immobilisiert und am Boden einer Färbeküvette mit Hilfe von Klemmen gehalten (Abbildung 1, Seite 7). Von allen bis dahin erprobten Verfahren erschien es am geeignetsten und diente als Grundlage der folgenden Experimente.

Im Anschluss an die Visualisierung der Antikörperbindung aus den vorangegangenen Versuchen sollte nun die Bindung der mononukleären Zellen an die Kapillaren sichtbar und damit überprüfbar gemacht wurden. Die Versuche werden im Einzelnen besprochen.

Versuchsreihe I :

In diesem Versuch wurden zwei methodische Änderungen vorgenommen:
Zur Minderung der Thrombozytenzahl wurden der Präparation der mononukleären Zellfraktion drei Waschschritte hinzugefügt. Die aus dem Überstand der Ficoll- Präparation abpipettierte mononukleäre Fraktion wurde in 50 ml Laborröhrchen (Greiner, Labortechnik) ad 50 ml mit PBS o. Ca resuspendiert und über 10 Minuten bei 1200 U/min (entsprechend 326 x g) zentrifugiert. Es folgte das Abgießen des Überstandes und die Resuspension der Zellen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Die letzte Resuspension erfolgte in 5% BSA in PBS o. Ca.
Mit dem Ziel, die Gerinnungsneigung und damit die Klumpung der Zellen in Suspension sowie an den Kapillaren zu vermindern, wurde der Zellsuspension sowie allen Blockungs- und Spüllösungen 5 mmol/l EDTA zugegeben.
Im **ersten Teilversuch** zur Anwendung kamen Kapillaren vom Typ `Microspheres´ und `Microspheres mit geblockten Amingruppen´. Die Inkubation der Kapillaren erfolgte für jede genannte Kapillarenart in 10µg/ml, 20µg/ml und 50µg/ml Campath für 12 h bei 4°C im Überkopfschüttler. Dabei wurden pro Kapillarentyp und für jede Campath Antikörperkonzentration 4 Kapillaren angesetzt.
Im **zweiten Teilversuch** wurden Kapillaren vom Typ `Glas´, `Amin´, `Amin mit geblockten Amingruppen´, `Microspheres´ und `Microspheres mit geblockten Amingruppen´ nur mit einer Antikörperkonzentration von 10 µg/ml Campath IgG in gleicher Weise vorbereitet.
In beiden Teilversuchen folgte danach die Blockierung der übrigen Bindungsvalenzen mit 0,5% BSA für 12 h (der Lösungsansatz aller Blockierungs- und Spüllösungen erfolgte wie unter den Vorversuchen ausgeführt mit 5 mmol/l EDTA). Zur Inkubation in Zellsuspension wurden 10.000/µl mononukleäre Zellen in 5 mmol/l EDTA in PBS für eine halbe Stunde angesetzt. Nach Inkubation in der Färbeküvette wurde von den 4 Kapillaren einer Spezifikation (Kapillartyp + Antikörperkonzentration) zwei mikroskopiert (Teil A der Kapillaren), die übrigen (Teil B) in der Färbeküvette abgelöst.

Die in Zellsuspension inkubierten Kapillaren wurden mit 0,5% BSA in PBS 2x durch vorsichtiges Ein- und Auspipettieren gewaschen. Danach erfolgte das Mikroskopieren des Teil A der Kapillaren. Die übrigen zwei Kapillaren (Teil B) verblieben in der Färbeküvette und wurden durch kräftiges Schütteln für 20 min abgelöst. Nach Ablösung erfolgte die Beurteilung von einer Kapillare jeder Spezifikation unter dem Mikroskop. Zur Zellzählung in der Suspension nach Ablösung wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 1800 U/min sedimentiert und in 1-2 ml Volumen resuspendiert. Die Auszählung der Zellzahl erfolgte in der Neubauer- Zählkammer in typischer Weise wie in Vorversuch j nach Einpipettieren eines geringen Volumens Ethidiumbromid/Acridinorange Gebrauchslösung.

Versuchsreihe II :

Der Versuchsaufbau der beiden Teilversuche dieser Versuchsreihe entsprach bis zum Ablösevorgang dem aus Versuchsreihe I. Zur Ablösung wurden die Kapillaren in 2,5 ml Greiner Laborröhrchen mit Stopfen gegeben und in der Bindungsebene kräftig geschüttelt. Die Zellzählung in der Suspension nach Ablösung erfolgte wie oben beschrieben. Zwei Kapillaren jeder Spezifikation wurden *vor*, die übrigen zwei *nach* Ablösung im Leitz Aristoplan unter Blau- Fluoreszenz und Durchlicht mikroskopiert. Die beiden Teilversuche wurden unter identischen Bedingungen durchgeführt.

2.6.1 Experimente unter Verwendung einer Säule

Mit dem Ziel, den aufwendigen und störungsanfälligen Vorgang der Inkubationsvorgänge in einer Färbeküvette zu verbessern und das Risiko der Kontamination zu verringern, wurde für die folgenden Experimente ein Säule entwickelt, die mit Zu- und Ableitungen zum einen ein geschlossenes System darstellte, zum anderen einen deutlich schonenderen Inkubationsvorgang und Wechsel der Lösungen und Suspensionen ermöglichte.

2 Säulen unterschiedlicher Größe wurden gefertigt: Erstere bestand aus dem Mittelteil einer 25 ml Falcon Laborpipette (Becton/Dicksonson; Dublin Ireland), die am Ober- und Unterende mit dem Gummistopfen einer 1 Liter NaCl Infusionsflasche verschlossen war. Zweitere bestand aus einer Einmalspritze 60 ml (Plastipak Luer-Lok Becton Dickson, Dublin Ireland) mit 2 Spritztenstempeln als Stopfen. Als Ein- und Auslaßstutzen dienten für beide Säulentypen Falcon 2 ml Pipetten.

Als Verbindung zur Schlauchpumpe war ein konventionelles Infusionssystem (Intrafix Schwerkraftinfusionsschlauch) aufgesteckt, in den 2 Zweiwege-Weichen (1 S-2-Verbinder, Intrafix) eingeschraubt waren. Deren freie Schlauchenden waren die Einfüll- bzw. Ablaßöffnungen eines ansonsten geschlossenen Systems. Als Behälter für den Zellpool dienten Transfusionsbeutel für Blutzellen (Baxter Fenwall). Die Einleitung der Zellsuspension erfolgte unter Schwerkrafteinfluß. Zum Einspritzen und Absaugen der Spüllösungen konnten 50 ml Einmalspritzen auf Ein- bzw. Auslaßöffnungen aufgeschraubt wurden. Abbildung 3 (Seite 37) stellt die Säule aus einer 60 ml Einmalspritzte dar.

Zur kontakt- und reibungsfreien Lagerung der Kapillaren in den Säulen wurden aus hartem Kunststoffpolymerschaum runde Stempel ausgestanzt, die mit einer entsprechenden Zahl kleiner Löcher versehen als Lager für bis zu 19 Kapillaren dienten. Als Halter für die Anordnung diente ein Metallständer mit zwei Armen und Schraubklemmen für die fertigen Säulen mit angeschlossenem Schlauchsystem. Mit Schlauchklemmen wurde nicht benötigter Schlauchweg geschlossen. Für die Durchmischung sorgte eine Schlauchpumpe (Variopex II, LKB Bromma, Schweden) mit 120 ml/h.

Abbildung 3 auf der folgenden Seite zeigt den Versuchsaufbau

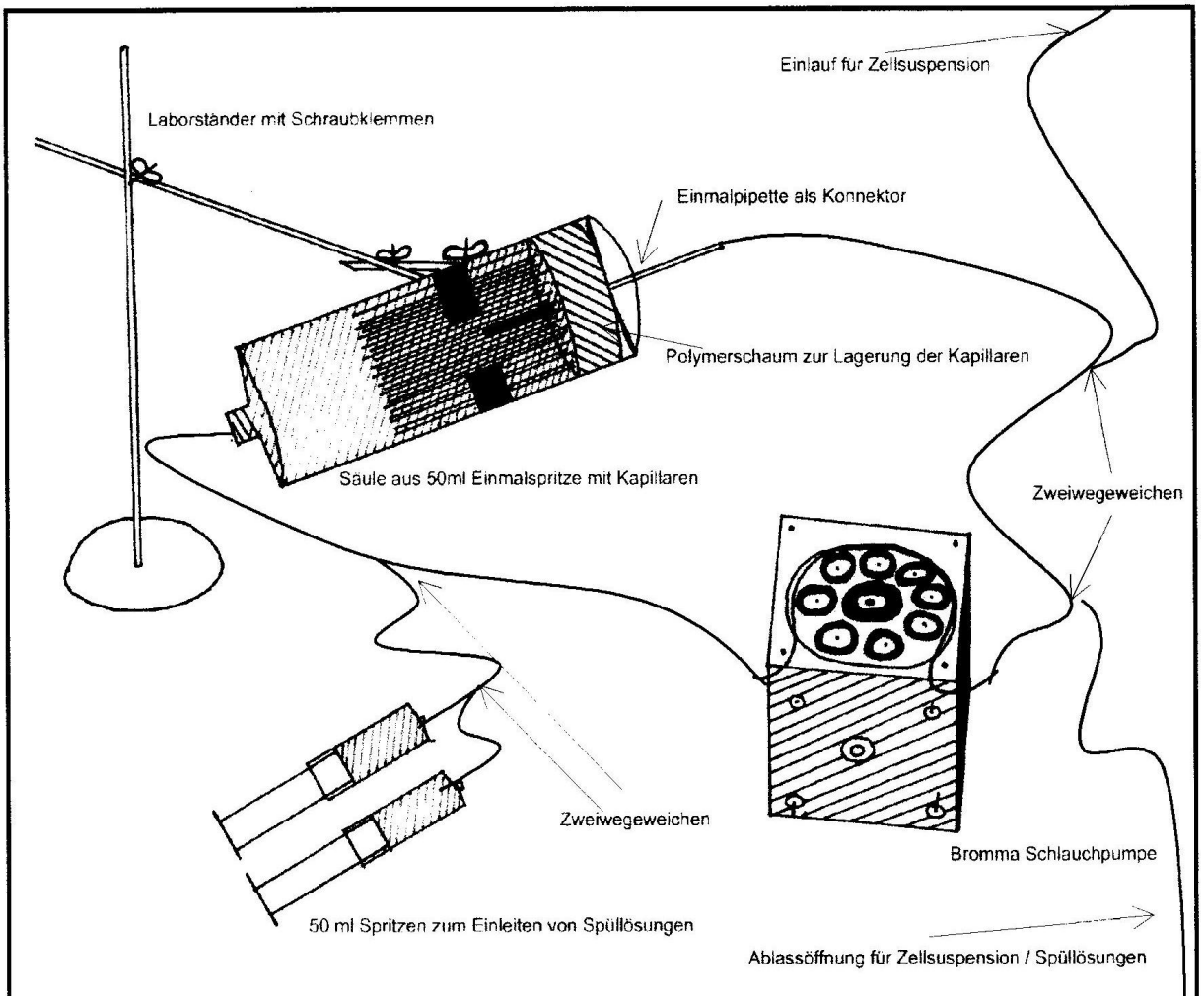


Abbildung 3 skizziert den Versuchsaufbau mit der selbstgebauten Säule aus 50ml Einmalspritze. Nicht benötigter Schlauchweg wurde mit Schlauchklemmen verschlossen.

Vorbereitung der Inkubation

Der Ansatz der Kapillaren erfolgte wie unter **Versuch I** beschrieben mit einer Antikörperkonzentration von 5, 10 und 20 µg/ml Campath IgG Antikörper. Vor jeder neuen Inkubation wurden Säule, Polymerschaumstempel und Schlauchsystem für 30 Minuten mit 0,5% BSA in PBS Lösung durchspült. Nach Ablassen der Flüssigkeit konnte der Infusionsschlauch mit der Zellsuspension an die untere Einlaßöffnung angeschraubt werden. Zur Inkubation in Zelllösung wurden die vorbereiteten Kapillaren aus der Proteinlösung genommen, zügig in den vorbereiteten Polymerschaumstempel eingesetzt und dieser in die Säule eingebracht.

Inkubation und Spülen der Säule

Die Befüllung der Säule erfolgte von unten nach oben um Verwirbelungen zu vermeiden. Nach Schließen des Systems und Starten der Schlauchpumpe wurde eine Inkubationszeit von 30 Minuten eingehalten. Eine Neigung von 20% zur Horizontalen hatte sich erst im Verlauf der Versuche als günstigste Einstellung der Säule erwiesen. Zur Entfernung der Zellsuspension aus dem System wurde 5%-BSA in PBS Lösung in die Säule eingeleitet. Das höhere spezifische Gewicht der Lösung gegenüber der Zellsuspension (in 0,5% BSA) führte zu einer Phasenbildung und damit zu einem Herausheben der Inkubationslösung aus der Säule. Im Anschluss daran wurde die Säule in umgekehrter Richtung (von oben nach unten) mit 250 ml 0,5% BSA in PBS gespült. Eine vollständig klare Spüllösung konnte am Ende des Vorgangs gewonnen wurden.

Aufarbeitung der Kapillaren

Nach Ablassen der Lösung und Entfernen des oberen Stempels konnte der Polymerschaumstempel mit den eingesteckten Kapillaren entnommen und einzeln in PS 2,5 ml Röhrchen mit BSA Lösung gegeben wurden. Nach Abschluß der Experimente mit den inkubierten Kapillaren wurde die Aufbewahrungslösung auf ihren Zellgehalt untersucht. Nach Zentrifugation mit 3000/min erfolgte die Resuspension in 1 – 2 ml Volumen und Auszählung der Zellzahl in der Neubauer Zählkammer. Als weitere Schritte in der Aufarbeitung der Kapillaren folgte für den einen Teil A der Kapillaren eine kurze Inkubation in Ethidiumbromid/ Acridinorange Lösung für ca. 30 Sekunden. Anschließendes Eintauchen in ein großes Volumen PBS diente dem Spülen der Kapillaren, die dann wieder in die Röhrchen gegeben und bis zur Mikroskopie aufbewahrt wurden. Der Teil B der inkubierten Kapillaren wurde in 2,5 ml Röhrchen gegeben und bei 2500/min (g x 272) zentrifugiert.

Versuchsreihe III

Im **ersten** Versuch dieser Reihe wurden nur Kapillaren des Typs `Microspheres mit geblockten Amingruppen´ verwandt. Von diesen wurden vier pro Ansatz in Campath IgG Antikörperlösungen der Konzentration 10, 20, 50 und 100 µg/ml für 12h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert.
Im **zweiten** Versuch und im **dritten** Versuch der Reihe waren Kapillaren der Typen `Glas´, `Amin´, `Amin mit geblockten Amingruppen´, `Microspheres´, `Microspheres mit geblockten Amingruppen´ verwendet worden. Diese waren mit Antikörperkonzentrationen 20µg/ml bzw. 50µg/ml angesetzt worden. Die Zugabe von 5 mmol/l EDTA für alle Lösungen und Suspensionen war hier, wie auch in allen weiteren Ansätzen, beibehalten worden. Es folgte die Blockierung der verbliebenen Bindungsvalenzen in 0,5% BSA für 12h. Nun wurde nach Ficoll- Präparation eine Zellsuspension aus mononukleären Zellen (MNC- Fraktion) hergestellt und auf eine Zellzahl von 10.000 /µl eingestellt. Nach Einsetzen der Kapillaren in die vorbereitete Säule erfolgte die Befüllung mit der Zellsuspension und Inkubation unter Durchmischung mit der Schlauchpumpe für 30 Minuten. Die Zellsuspension wurde wie oben beschrieben mit BSA 5% herausgehoben und die Säule mit 0,5% BSA zweimal nachgespült. Auf das Nachspülen mit 0,5% BSA wurde im dritten Versuch der Reihe verzichtet. Die Kapillaren wurden nun vorsichtig entnommen und in 2,5 ml Laborröhrchen gegeben. Dort erfolgt die Färbung mit Ethidiumbromid/ Acridinorange für zwei Kapillaren pro Ansatz und anschließende Mikroskopie im Leitz Aristoplan unter Blau- Fluoreszenz und Durchlicht. Die übrigen zwei Kapillaren wurden in eine Labor- Einmalpipette gegeben und diese in ein Eppendorfröhrchen getaucht, welches mit 2 ml 0,5% BSA gefüllt ist. Durch Aspirieren und Exprimieren der Pipette wurde nun entlang der Kapillare eine Flüssigkeitsströmung mit hoher Geschwindigkeit in der Bindungsebene der angelagerten Zellen erzeugt. Es folgte nun die Zugabe von Ethidiumbromid/ Acridinorange Lösung und die Auszählung der Zellzahl im Coulter Zellzählgerät.

Versuchsreihe IV

Wegen unbefriedigender Ergebnisse im vorherigen Versuch wurde entschieden, einen weiteren Versuch mit der Färbeküvette zu unternehmen und dieses Verfahren dem direkten Vergleich mit der Säulenmethode gegenüberzustellen. Es erfolgte der Ansatz von Kapillaren vom Typ `Amin mit geblockten Amingruppen´, und `Microspheres mit geblockten Amingruppen´ in Campath IgG Antikörper der Konzentra-

tionen 20 µg, 100 µg, 200 µg/ml sowie Campath IgM Antikörper der Konzentration 20µg/ml. Die Inkubations- und Spülvorgänge für die Säule entsprachen denen der vorangegangenen Versuche, jene für die Färbeküvette denen aus Versuchreihe I. Als Erfolgskontrolle wurden die Kapillaren ohne vorherigen Ablösevorgang unter Blau- Fluoreszenz und Durchlicht mikroskopiert und von zwei Auswertern unabhängig auf deren Zellbesatz hin beurteilt.

Versuch V

Nach Erfahrungen mit der Färbeküvette aus den Vorexperimenten wurden bei den nun folgenden Versuchen die Säule auf 20° zur Horizontalen gekippt. Es wurden für den ersten Versuch Kapillaren von Typ `Amin mit geblockten Amingruppen´, und `Microspheres mit geblockten Amingruppen´ in Campath IgG Antikörper der Konzentrationen 20µg/ml und 50µg/ml inkubiert. Für den zweiten Versuch wurden Ansätze mit je 2 Kapillaren für jede Kapillaren/Antikörperkombination. Die verwendeten Kapillaren sind vom Typ `Glas´, `Microspheres´, `Microspheres mit geblockten Amingruppen´, ebenso wie eine unbehandelte Glaskapillare und eine Glaskapillare, welche alle Wasch- und Blockierungsschritte durchlaufen hatte, jedoch nicht in Antikörper inkubiert worden war. Als Antikörper werden verwandt: Campath IgG 50 µg/ml und Campath IgM 50 µg/ml sowie W6/32 Antikörper 50 µg/ml. Die Vorgehensweise entsprach der aus Versuchsreihe IV mit dem Unterschied der oben genannten Kippung der Säule. In beiden Versuchen erfolgte die Auswertung durch Mikroskopie wie in den vorangegangenen Versuchen. Außerdem wurden im ersten Versuch die adhärenten Zellen durch Erzeugung einer heftigen Strömung in einer Laborpipette abgelöst und anschließend durch Zellzählung in der Neubauerzählkammer ausgewertet.

Versuch VI

Hier sollte versucht werden, in einem indirekten Verfahren Zellen an Microspheres zu binden, indem die Zellsuspension mit einer Zellzahl von 10.000 /µl mit Campath IgG Antikörper einer Konzentration von 20 µg/ml inkubiert wurde. Ziel war die Anlagerung der so präparierten Zellen an Microspheres, die zuvor GAM-FITS Antikörper kovalent gebunden hatten.

Versuch VII

In diesem Versuch wurde geprüft, ob ältere Kapillaren einen Aktivitätsverlust erleiden, bzw. ob die Lagerung von Antikörper beladenen Kapillaren einen Einfluß auf die Bindungsfähigkeit hat.
Es wurden zwei Kapillartypen untersucht. Die übrigen Versuchsbedingungen entsprachen denen der vorangegangenen Versuche.

1. Microspheres Kapillaren, welche 4 Wochen vor Versuchsbeginn mit Antikörpern Campath IgG 50 µg/ml, Campath IgM 50 µg/ml und W6/32 50 µg/ml in der üblichen Weise inkubiert worden waren.
2. Microspheres Kapillaren, welche am Vortag mit Antikörpern inkubiert worden waren.
3. Als Negativkontrolle je eine Glaskapillare, welche alle Inkubationsschritte mit Ausnahme der Inkubation in Antikörper durchlaufen hatte und
4. eine völlig unbehandelte Glaskapillare

Versuchsreihe VIII

In diesem Experiment sollte anhand verschiedener Campath IgG Antikörper- Konzentrationen eine geeignete Konzentration für die Beladung und Ablösung von Targetzellen gefunden werden. Um eine größere Zahl an Kapillaren in einem Ansatz untersuchen zu können, kam ab diesem Experiment die oben beschriebene größere Säule mit einer Kapazität von 15 Kapillaren zu Einsatz. Es wurden jeweils zwei Kapillaren der Typen `Glas´, `Amin´, `Amin mit geblockten Amingruppen´, `Microspheres´, `Microspheres mit geblockten Amingruppen´ mit Antikörperkonzentrationen von Campath IgG 5 µg/ml und 10 µg/ml sowie Campath IgM mit 5 µg/ml und 10 µg/ml verwendet. Da zum Zeitpunkt des Experiments eine neue Charge an Kapillaren vom Typ `Amin mit geblockten Amingruppen´ und `Microspheres mit geblockten Amingruppen´ aus Israel eingetroffen war, wurden von dieser separat je zwei Kapillaren mitgeführt und mit `neu´ gekennzeichnet. Die Vorbereitung der Kapillaren entsprach der aus den vorangehenden Versuchen. Ebenso wurde die Inkubation unter denselben Bedingungen wie bei Verwendung der kleinen Säule in Versuch V durchgeführt. Die Erfolgskontrolle bestand aus Mikroskopie einer der beiden Kapillaren desselben

Ansatzes im Leitz Aristoplan unter Fluoreszenz und Durchlicht und der Ablösung und Zellzählung nach dem oben beschriebenen Pipettenverfahren. Die Zellkonzentrationen in 2,5 ml Ablösesuspension waren ausreichend hoch, um maschinell im Coulter ausgewertet zu werden.

Versuchsreihe IX

Hierunter wurde eine Reihe von Versuchen zur Spezifitätsbestimmung zusammengefasst. Die Versuchsreihe stützte sich auf die Verwendung der im Abschnitt 2.2 Antikörperwahl beschriebenen anti-CD20 (Anti B-Zell) Antikörper (von Dianova) zur Selektion von B- Lymphozyten. Die Identifikation der Zellen nach Ablösung erfolgte auf dem Wege der Immuntypisierung durch erneuten Ansatz in B- Zell Antikörper gefolgt von Inkubation in GAM FITC Antikörper und anschließender Mikroskopie.
In den Versuchen eins bis vier wurden Kapillaren der Typen `Glas´, `Amin mit geblockten Amingruppen´, `Microspheres mit geblockten Amingruppen´ in B- Zell Antikörpersuspension einer Konzentration von 10µg/ml und 20 µg/ml vorbereitet:

- vier mal zwei Kapillaren vom Typ `Microspheres mit geblockten Aminresten´ jeweils inkubiert in 20 µg/ml und 10 µg/ml B- Zell Antikörper
- vier mal zwei Kapillaren vom Typ `Amin mit geblockten Amingruppen´ jeweils inkubiert in 20 µg/ml und 10 µg/ml B- Zell Antikörper
- vier mal zwei Kapillaren vom Typ `Glas´ jeweils inkubiert in 20 µg/ml und 10µg/ml Anti B- Zell Antikörper.

Verwendet wurde Säule B mit einer Inkubationszeit der Zellsuspension von 30 Minuten und einem Neigungswinkel von 20% zur Horizontalen unter Durchmischung mit einer Schlauchpumpe bei 300 ml/h
Die Zellsuspension wurde mit 5% BSA Lösung aus der Säule gehoben und anschließend mit 500ml 0,5% BSA Lösung nachgespült.
Die gewonnenen Kapillaren wurden in 2 ml Röhrchen gegeben und im Thermo-Schüttler abgelöst. Es folgte eine kurze Inkubation der Kapillaren in Ethidiumbromid/Acridinorange Lösung und die Auswertung in der Mikroskopie.
Die gewonnene Zellsuspension wurde bei 10000 U/min in der Eppendorf Zentrifuge sedimentiert und in ca. 1 ml 0,1% BSA resuspendiert.
Alle vier Versuche ergaben nach dem letzten Resuspensionsschritt im Anschluss an die Immuntypisierung ein Volumen von ca. 1 ml mit einer Zellkonzentration, die für die mikroskopische Auswertung in der Neubauerzählkammer ausreichend war.

Weiter erfolgte eine Inkubation mit anti-CD20 (anti B- Zell) Antikörper in einer Konzentration von 2 µg/100 µl für 25 min. Das Vorgehen bei der Typisierung folgte den Anweisungen des Herstellers.

Nach Inkubation mit Sekundärantikörper (GAM-FITC- Ak) und den erforderlichen Waschzyklen wurde die Suspension unter Blau- Fluoreszenz in der Neubauerzählkammer ausgewertet. Es erfolgte die Auszählung der Gesamtzellzahl, sowie die Auszählung der Fluoreszenz- positiven Zellen. Als Kontrolle wurde das Ausgangszellmaterial mittypisiert: Als Positiv- Kontrolle galt die MNC- Fraktion, welche als Ausgangsmaterial für die Inkubation der Kapillaren verwendet wurde und einer vollständigen Typisierung mit Primär- und Sekundärantikörper sowie allen erforderlichen Waschzyklen unterzogen wurde. Als Negativkontrolle galt die MNC- Fraktion, welche als Ausgangsmaterial für die Inkubation der Kapillaren verwendet wurde und unter Auslassung des Anti B- Zell Antikörpers alle Inkubationsschritte durchlaufen hatte.
Wegen der Bedeutung des Ergebnisses für die Arbeit insgesamt wurden 4 Versuchsansätze mit identischen Versuchsbedingungen durchgeführt. Für alle Kombinationen aus Kapillartyp und Antikörperkonzentration wurden 2 identische Kapillaren mitgeführt. Eine Kapillare diente nur der direkten Mikroskopie nach Inkubation. Deren Färbung erfolgte mit Ethidiumbromid/ Acridinorange wie in den vorangegangenen Versuchen. Die zweite Kapillare durchlief den Ablöseprozess.

Versuchsreihe X

Für diesen Versuch wurden je zwei Kapillare vom Typ `Glas´, `Amin mit geblockten Amingruppen´, `Microspheres mit geblockten Amingruppen´ wie im vorangegangenen Versuch in B- Zell Antikörpersuspension mit einer Konzentration von 10µg/ml und 20 µg/ml vorbereitet.
Die Kapillaren wurden nach Inkubation in der Zellsuspension zweimal in 2ml 0,5% BSA in PBS gespült und im Anschluss in 2 ml anti-CD20 (anti B- Zell) Antikörperlösung einer Konzentration von 2 µg/ml eingebracht. Die Inkubation erfolgte für 10 Minuten unter sanfter Durchmischung auf dem „Bellydancer“. Anschließend wurden die Kapillaren entnommen und dreimal in einem großen Volumen 0,5% BSA gespült.

Die so vorbereiteten Kapillaren wurden in einer Lösung von GEM-FITC Fluoreszenzantikörper der Konzentration 5µg/ml unter denselben Bedingungen wie mit anti B-Zell Antikörper inkubiert und ebenso gespült.

Die Mikroskopie erfolgte im Leitz Aristoplan unter Blaufluoreszenz und gleichzeitigem Durchlicht zur Darstellung der Kapillarkontur. Sie war wegen Problemen mit der geringen Tiefenschärfe erschwert.

Die Auszählung gelang, nachdem die noch nassen Kapillaren auf ein Mikrometerraster aufgelegt wurden und zwischen Kapillaroberfläche und Papier der Fokusbereich mehrfach verändert wurde. Fotodokumentation war aufgrund mangelnder Tiefenschärfe in diesem Versuchsteil nicht praktikabel. Es erfolgte die Auszählung von 4 μm^2 und Darstellung des Verhältnisses von GEM-FITC- negativen zu GEM-FITC-positiven Zellen.

2.7 Anmerkung bezüglich der statistischen Aufarbeitung der Ergebnisse

Die Untersuchung von Microspheres auf ihre Eignung für die Selektion von Zellmaterial beruht auf der Durchführung von Einzelversuchen.

Die Einzelversuche wurden zu Gruppen von Versuchen mit ähnlichem Versuchsaufbau zusammengefasst. Dennoch sind die Ergebnisse aus den Einzelversuchen nicht vergleichbar und werden in form von kommentierten Tabellen dargestellt.

Eine Zusammenfassung im Rahmen einer statistischen Aufarbeitung ist daher nicht sinnvoll und wurde nicht unternommen.

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche mit Zellen

Anfängliche Versuche zeigten häufig Kapillaren mit angelagerten Zellklumpen. Die mit Microspheres besetzten Kapillaren schienen deutlich mehr Zellen angelagert zu haben. Ebenfalls lagerten die mit aktivierten Amingruppen gesetzten Kapillaren vermehrt Zellen an. Die unbehandelten Glaskapillaren waren weitgehend zellfrei.
Zur Blockierung der nach Bindung von Antikörper verbliebenen Bindungsvalenzen erfolgte die Inkubation der Kapillaren anfänglich mit 0,1% BSA in PBS für 2 Stunden. Die genannte Blockierung führte im Verlauf der Versuche zu inkonstanten Ergebnissen. Nach Intensivierung des Blockierungsvorgangs mit 0,5% BSA in PBS Lösung für 14 Stunden konnte die unspezifische Bindung von Zellen ebenso wie von Protein deutlich vermindert werden.
Der Versuch die MNC Fraktion in Medium anstelle von 0,5% BSA zu resuspendieren führte zu vermehrter Klumpung und wurde aufgegeben.
Die Ablösung des angelagerten Zellmaterials durch Zentrifugation erbrachte kein greifbares Ergebnis. Ebenso war der Versuch die Zellsuspension durch Zytozentrifugation zu konzentrieren erfolglos. Verstärkte Scherkräfte wurden durch die Erhöhung der Zentrifugendrehzahl auf 1358 x g versucht. In der Ablösesuspension fand sich zwar eine höhere Zellkonzentration, es kam jedoch zur Fraktur von 2 Kapillaren.
Weiter wurde versucht, die Ablösung der Zellen durch pH- Modulation und Einsatz von Detergens zu verbessern. Ersteres brachte keine merkliche Verbesserung der Ablösbarkeit, letzteres führte zur nahezu vollständigen Ablösung des Zellmaterials. Eine Aussage zu Viabilität des abgelösten Materials konnte zu diesem Zeitpunkt nur begrenzt gemacht werden. Aus der mikroskopischen Morphologie konnte von einer weitgehenden Zerstörung der Zellen ausgegangen werden.
Auf der Grundlage eines Untermischungsversuchs mit Lymphozyten- und Granulozyten- Suspensionen zu jeweils gleichen Anteilen war versucht worden die Selektion auf Spezifität zu prüfen. Wegen unzureichender Ablösung konnte kein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden.

Mittels Viabilitätsfärbung durch Ethidiumbromid/Acridinorange war erstmals durch Auszählung in der Neubauerzählkammer die quantitative Auswertung der Ablösesuspension möglich. Die Mikroskopie der Kapillaren nach Ablösung zeigte aber dass der weitaus größere Teil der angelagerten Zellen auf der Kapillare verblieben war.
Nach Modifikation des Inkubationsverfahrens und Lagerung der Kapillaren in einer Färbeküvette zeigte sich bei der mikroskopischen Untersuchung verschiedener Glasoberflächen (an der Küvette, an den Glasobjektträgern und den unbehandelten Anteilen der Kapillaren) eine große Menge von Zellmaterial. Es musste daher von einem erheblichen Anteil unspezifischer Bindung ausgegangen werden.

3.2 Versuche zur Antikörperbindung

Die ernüchternden Ergebnisse mit Zellen aus den Vorversuchen machten erforderlich, den Charakter der Proteinbindung an Kapillaren unterschiedlichen Typs genauer zu untersuchen.
In den Versuchen zur Proteinbindung zeigte sich, dass es möglich ist, die Bindung von Antikörpern an Kapillaren vermittels eines fluoreszierenden Sekundärantikörpers zu visualisieren. Wie in den Vorversuchen zur Zellbindung erfolgte die Auswertung in semiquantitativer Form. Die Fluoreszenzmuster unterschiedlicher Kapillartypen zeigten deutliche Differenzen sowohl in Hinsicht auf die Verteilung der Fluoreszenz auf der Kapillare wie auch in Hinsicht auf die Leuchtkraft. Kapillaren mit kovalent gebundenen Microspheres zeigten ein spike- förmiges Fluoreszenzmuster und fluoreszierten insgesamt stärker als die Kontrollgruppen. Die Beladung der Kapillaren mit unterschiedlichen Antikörper- Konzentrationen führte nicht zu wahrnehmbaren Differenzen im Fluoreszieren.

Die Auswertung richtete sich nach den folgenden Kriterien:

Die Auswertung durch zwei Auswerter hat sich nach den folgenden Bewertungsmaßstäben gerichtet:

0	=	keine Fluoreszenz
0 -+	=	nur Rand der Kapillare fluoresziert schwach
+	=	einzelne kleine Flächen fluoreszieren
++	=	grössere Flächen fluoreszieren (auch wenn inhomogen)
+++	=	gesamte Zirkumferenz fluoresziert

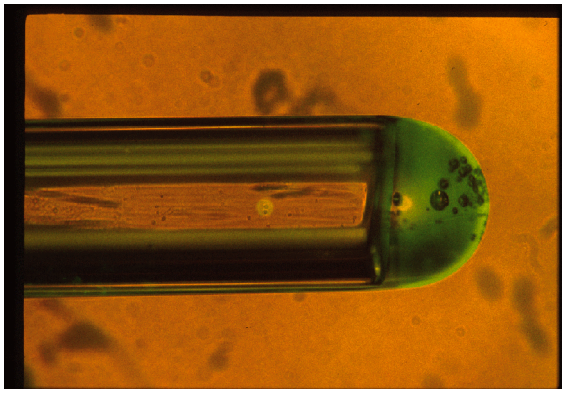


Abbildung 4

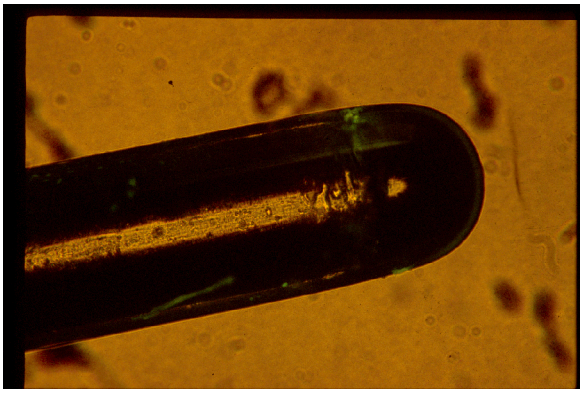


Abbildung 5

Die Abbildungen zeigen zwei Kapillaren nach Fluoreszenzmarkierung mit GEM-FITC Sekundärantikörpern:
Erstere wird von beiden Auswertern übereinstimmend mit
„++“ bewertet (Microspheres + 100µg Campath)
Zweitere wird ebenfalls übereinstimmend mit
„0-+“ bewertet (Glas + 100µg Campath)
Zur Darstellung der Kapillarkontur wird dem Fluoreszenzlicht etwas Durchlicht beigemischt

Nach Blockierung der Kapillaren für 2 Stunden in 0,1% BSA und anschließender Inkubation in die genannten Antikörperlösungen zeigte sich nur noch schwache Fluoreszenz. Eine Blockierung mit einer BSA- Konzentration von 0,1% BSA für 30 Minuten im Sinne einer Vorblockierung erbrachte im Vergleich mit ungeblockten Kapillaren inkonstante Ergebnisse und wurde aufgegeben.

Dagegen konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der Kapillaren in 0,5% BSA für 14 Stunden eine wirksame Methode der vollständigen Blockierung aller Bindungsvalenzen darstellt.

3.3 Ablösen von Sekundärantikörpern

Nachdem weitgehend geklärt war, welche Bedingungen für die Microspheres- Protein- Bindung als günstig anzusehen war und wie sich Kapillaren wirksam gegen unerwünschte Bindungen blocken ließen, war zu klären, ob die Qualität der entstandenen Bindung tatsächlich dem angenommenen Modell entsprach. Insbesondere war zu klären, ob gebundene Sekundärantikörper wirklich eine spezifische Antigen- Antikörper Bindung mit den kovalent gebundenen Primärantikörpern eingegangen war oder ob eine unspezifische Bindung vorlag: Nach der Bindung von Sekundär- (Fluoreszenz-) Antikörper sollte die entstandene Ag- Ak- Bindung durch pH- Modulation lösbar sein, d.h. eine Fluoreszenz- tragende Kapillare sollte nach Inkubation in Glycin pH3 ihre Fluoreszenz verlieren, anschließend aber wieder Sekundärantikörper binden können.
Es konnte reproduzierbar gezeigt werden, dass die Bindung von Sekundärantikörper unter pH- Modulation reversibel ist. Die wirksame Blockierung der überschüssigen Bindungsvalenzen auf den Kapillaren ist Bedingung für die vollständige Ablösung des Sekundärantikörpers. Ist aufgrund unvollständiger Blockierung die Sekundärantikörper- Bindung durch pH- Modulation nicht lösbar, ist auch die Ablösung durch Deterens erfolglos.
Die nahezu vollständige Ablösung von Sekundärantikörper lässt deutlich werden, dass die Bindung tatsächlich wie angenommen dem Modell einer Antigen- Antikörperbindung entspricht.

3.4 Versuche zur Anlagerung und Ablösung von Zellen

Die Ergebnisse aus den Versuchen werden im Einzelnen besprochen.
In den folgenden Experimenten wurden die Verfahren zum Umgang mit mononukleären Zellen aus den Vorversuchen weiterentwickelt. Dazu gehörten im Besonderen die Optimierung der zur Inkubation der Kapillaren verwendeten Antikörperkonzentra-

tion sowie die weitere Verbesserung der Inkubationstechnik und der Spülung und Ablösung im Sinne einer zellschonenden Verfahrensweise.

Wie in **Vorversuch j** (wiedergegeben im Anhang) beschrieben, wurden die Kapillaren in Hinblick auf ihren Zellbesatz nach Färbung mit Ethidiumbromid/Acridinorange unter Fluoreszenzlicht beurteilt. Die Bewertung erfolgte wie bei den Versuchen zur Proteinbindung in semiquantitativer Weise und richtete sich nach den folgenden Kriterien:

„0“ : keine Zellen auf der Kapillare beobachtet
„0-+“: vereinzelte Zellen
„+“: vermehrte Zellzahl, einzelne Zellen jedoch deutlich abgrenzbar
„++“: z.T. dichter Zellrasen abwechselnd mit zellarmen Abschnitten
„+++“ : dichter Zellrasen
Beurteilt wurde die Kapillarenhälfte mit dem größten Zellbesatz.

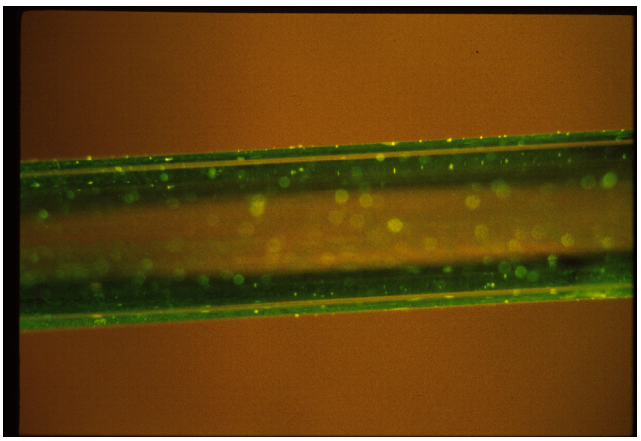


Abbildung 6

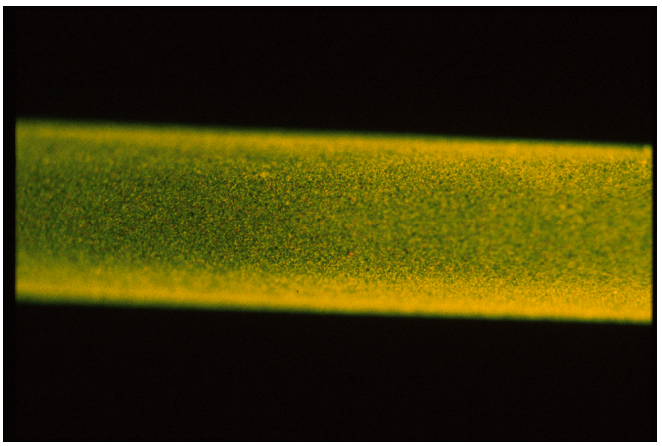


Abbildung 7

Die Abbildungen zeigen immobilisierte Leukozyten auf der Oberfläche zweier Kapillaren. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte durch Eintauchen der Kapillare in Ethidiumbromid/Acridinorange-Lösung.
Die Kapillare in Abbildung 6 ist mit Fluoreszenzlicht sowie zur Kenntlichmachung der Kapillarkontur mit Durchlicht bestrahlt. Sie wird von 2 Auswertern übereinstimmend mit „0-+“ bewertet.
Die Kapillare in Abbildung 7 ist nur mit Fluoreszenzlicht bestrahlt. Sie wird von 2 Auswertern ebenfalls übereinstimmend mit „+++“ bewertet.

Versuchsreihe I :

In diesem ersten Experiment der Untersuchungsreihe wurden Kapillaren vom Typ `Microspheres´ und `Microspheres mit geblockten Amingruppen´, welche mit verschiedenen Konzentration von Campath IgG Antikörperlösung inkubiert waren, auf ihren Zellgehalt vor und nach Ablösung untersucht. Aus Tabelle 1a wird deutlich, dass eine Korrelation zwischen der verwendeten Antikörperkonzentration und der Anlagerung von mononukleären Zellen besteht und dass im Ablöseverfahren ein Teil aber bei weitem nicht alle Zellen von den Kapillaren abgelöst wurden. Der Grund für die nicht vollständige Ablösung wurde darin gesehen, dass beim Schütteln der Färbeküvette keine ausreichenden Scherkräfte in der Bindungsebene erzeugt wurden.

Tabelle 1a: Zellbindung an Kapillaren in Abhängigkeit von der Antikörper-Konzentration

Kapillaren, die in Lösungen mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen vorbereitet wurden, werden vor und nach Ablösung der Zellen nativ mikroskopiert und der Zellbesatz semiquantitativ beurteilt

Microspheres						**Microspheres mit geblockten Aminen**					
50µg/ml		20µg/ml		10µg/ml		50µg/ml		20µg/ml		10µg/ml	
vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach
++	++	+	0-+	+	0-+	++	+	+	0-+	0-+	0

Tabelle 1b: **Zellbesatz und Zellzahl in Suspension**

Zellbesatz auf den Kapillaren bei einer Campath IgG Konzentration von 10µg/ml nach mechanischem Ablösemanöver und in Neubauerkammer ausgezählte Zellzahl

	Glas	**Amin**	**Amin gebl**	**Microspheres**	**Microspheres gebl**
Zellbesatz (nach Ablös.)	0	+	++	++	++
Zellzahl /µl	95	69	40	76	42

Tabelle 1b zeigt das Ergebnis aus dem zweiten Teilversuch. Hier wurden Kapillaren aller Typen auf ihren Zellbesatz nach Ablösung mikroskopiert. Die Zellen in der Ablösesuspension wurden in der Neubauer Zählkammer ausgezählt.

Wie im ersten Teilversuch blieb die abgelöste Zellzahl gering. Auf den Kapillaren fanden sich nach Ablösung noch grosse Mengen an Zellen. Welcher Anteil der ausgezählten Zellen tatsächlich von den Kapillaren abgelöst wurde und welcher Anteil möglicherweise als unspezifischer Rest nach Spülung in der Küvette verblieben ist, ließ sich in diesem Versuchsaufbau nicht unterscheiden. Um die Möglichkeit der

Kontamination zu vermindern, wurden in den folgenden Versuchen die Kapillaren zur Ablösung isoliert.

Versuchsreihe II

In den beiden Experimenten dieser Versuchsreihe war der Ablösevorgang dahingehend verändert worden, dass jede Kapillare einzeln im Laborröhrchen heftig in der Bindungsebene geschüttelt wurde. Die Ablösesuspensionen wurden in der Neubauer Zählkammer auf ihren Zellgehalt untersucht.

Tabelle 2a (Experiment 1): Bindung und Ablösung der Zellen

Die erste Zeile gibt die Antikörperkonzentration wieder, in der die Kapillaren vorbereitet waren, die zweite Zeile die Konzentration der Zellen, ausgezählt in der Neubauerkammer. Darunter ist semiquantitativ die auf der Kapillare gesehene Zellzahl vor und nach Ablösung wiedergegeben

Microspheres								**Microspheres mit geblockten Amingruppen**							
50µg/ml		20µg/ml		10µg/ml		0µg/ml		50µg/ml		20µg/ml		10µg/ml		0µg/ml	
125/µl		357/µl		78/µl		160/µl		78/µl		215/µl		297/µl		137/µl	
vor	na	vor	na	vor	na	vor	na	vor	na	vo	na	vor	na	vor	na
+	0	++	+	++	0-+	0	0	+	0	++	+	++	0-+	0	0

Tabelle 2b (Experiment 2): Die Versuchsbedingungen sind identisch mit denen in Experiment 1. Trotz insgesamt höherer Zellkonzentration in der Ablösesuspension verbleiben viele Zellen auf der Kapillare

.**Microspheres**								**Microspheres mit geblockten Amingruppen**							
50µg/ml		20µg/ml		10µg/ml		0µg/ml		50µg/ml		20µg/ml		10µg/ml		0µg/ml	
482/µl		512/µl		764/µl		379/µl		385/µl		487/µl		532/µl		125/µl	
vor	na	vor	na	vor	na	vor	na	vor	na	vor	na	vor	na	vor	na
++	+	+	0-+	+	0-+	0-+	0	++	+	+	0	0-+	0	0-+	0

Es zeigte sich in Tabelle 2a + b wiederum eine unvollständige Ablösung für alle geprüften Antikörperkonzentrationen. Die Tatsache, dass die Kapillaren ohne vorherige Antikörperinkubation (Negativ- Kontrolle) ihre wenigen (unspezifisch) gebundenen Zellen vollständig abgelöst haben, wirft die Frage auf, ob gerade die spezifisch gebundenen Zellen an der Kapillare verblieben sind. Die erhaltenen Zellzahlen in Suspension im Vergleich zur Zellzahl an den Kapillaren deuteten auf stärkere Bindungskräfte bei höherer Antikörperkonzentration hin.

3.5 Experimente unter Verwendung einer Säule

Versuchsreihe III

In dieser Versuchsreihe kam erstmalig eine selbstgebaute Säule zum Einsatz. Sie wurde in den folgenden Experimenten auf ihre Eignung geprüft.
Im **ersten Versuch** der Reihe wurden Kapillaren vom Typ `Microspheres mit geblockten Amingruppen´ in den Antikörperkonzentrationen 100µg/ml, 50µg/ml, 20µg/ml, 10µg/ml nach üblichem Muster inkubiert.

Tabelle 3: **Zellbesatz in Abhängigkeit von Antikörperkonzenration**

Direkte Fluoreszenzmikroskopie nach Inkubation in Zellsuspension und anschliessende Färbung mit Ethidiumbromid und Acridinorange für verschiedene Antikörperkonzentrationen

Ak - Konzentration	100µg/ml	50 µg/ml	20 µg/ml	10 µg/ml
Zellzahl	+	+	+++	+

Im Vergleich zu den vorangegangenen Experimenten mit der Färbeküvette war dieses Ergebnis unbefriedigend, weil sich keine Korrelation zwischen Antikörperkonzentration und gebundener Zellzahl einstellte.

Im **zweiten Versuch** dieser Versuchsreihe wurden Kapillaren vom Typ `Glas´, `Amin ´, `Amin mit geblockten Amingruppen´, `Microspheres´ und `Microspheres mit geblockten Amingruppen´ in Antikörperkonzentrationen von 20µg/ml und 50µg/ml Campath IgG inkubiert. Ansonsten blieben die Versuchsbedingungen konstant.

Tabelle 4: Verwendung unterschiedlicher Kapillartypen

Fluoreszenzmikroskopie bei Kapillaren unterschiedlichen Typs, vorbereitet mit der Antikörperkonzentration 50µg/ml und 20 µg/ml. Die Auswertung erfolgte durch zwei unabhängige Auswerter. Alle zur Verfügung stehenden Kapillarenarten werden eingesetzt. Ansonsten entsprechen die Bedingungen dem ersten Versuchsteil

	50 µg/ml Ak-Konzentration									
	Glas		Amin		Amin gebl		Mic		Mic gebl	
Auswerter	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
	0-+	0-+	+	+-++	0-+	0	+	+	+	0-+
	20 µg/ml Ak-Konzentration									
	Glas		Amin		Amin gebl		Mic		Mic gebl	
Auswerter	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
	0	0-+	++	++	0-+	0	+	0-+	0-+	0-+

Auch hier entsprach die Anlagerung nicht den zuvor in den Versuchen mit Antikörpern gewonnenen Ergebnissen. Hier mussten nach theoretischen Überlegungen die mit Microspheres beladenen Kapillaren deutlich stärker spezifisch Zellen binden. Die Zellbindung auf den Aminkapillaren war entweder unspezifisch oder beruhte auf einem anderen Bindungsprinzip als angenommen.

Im **dritten Versuch** der Reihe wurde der Frage nachgegangen, ob eventuell ein zu aggressives Waschverfahren für die Ablösung der Zellen vor der mikroskopischen Beurteilung verantwortlich war. Die Zellen wurden daher direkt aus der Inkubationslösung heraus gefärbt und mikroskopiert.

Tabelle 5: Spülen der Säule nicht Ursache für geringe Anlagerung

Mikroskopische Auswertung der inkubierten Kapillaren ohne vorherige Spülung der Säule mit 0,5% BSA. Alle übrigen Parameter entsprechen den vorangehenden Versuchen. Die Campath IgG Konzentration war 20µg/ml

	20 µg/ml Ak-Konzentration									
	Glas		Amin		Amin gebl		Mic		Mic gebl	
Auswerter	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
	++	++-+++	++-+++	++	+-++	+	+	+	0-+	+

Es wird ersichtlich, dass der Spülvorgang nicht die Ursache für die mangelhafte Anlagerung sein kann. Vielmehr müssen andere Differenzen zwischen der Inkubation in der Küvette und der in der Säule vorliegen.

Versuchsreihe IV

In dieser Versuchsreihe wurde nochmals die Färbeküvettenmethode mit der Säulenmethode verglichen.

Zur Anwendung kamen Kapillaren vom Typ `Amin mit geblockten Amingruppen´ und `Microspheres mit geblockten Amingruppen´. Es wurde die gleiche Antikörperbeladung wie in den Vorversuchen mit Campath IgG 20 µg/ml, 100 µg/ml und 200 µg/ml und Campath IgM 20 µg/ml eingesetzt. In Tabelle 6a + b werden die Ergebnisse nach Kapillartypen für die beiden Verfahren ´Säule` und ´Färbeküvette` dargestellt.

Tabelle 6a: Untersuchung der Kontrollgruppe `Amin mit geblockten Amingruppen

Mikroskopische Auswertung auf Zellbesatz nach Ethidiumbromid/Acridinorange- Färbung der inkubierten Kapillaren vom Typ `Amin mit geblockten Amingruppen´ durch zwei Auswerter

Amine geblockt	**Säule**							
	20 µg		100 µg		200 µg		IgM 20 µg	
Auswerter	I	II	I	II	I	II	I	II
	0	0	++	+-++	+-++	++	0	0
	Färbeküvette							
	20 µg		100 µg		200 µg		IgM 20 µg	
Auswerter	I	II	I	II	I	II	I	II
	+	+	0-+	0-+	0-+	0	0-+	0

Tabelle 6b: Untersuchung der Microsphereskapilleren

Mikroskopische Auswertung auf Zellbesatz nach Ethidiumbromid/Acridinorange- Färbung: Kapillaren vom Typ `Microspheres mit geblockten Amingruppen´ durch zwei Auswerter

Microspheres gebl.	**Säule**							
	20 µg		100 µg		200 µg		IgM 20 µg	
Auswerter	I	II	I	II	I	II	I	II
	+	+-++	0	0	++	+	+	+
	Färbeküvette							
	20 µg		100 µg		200 µg		IgM 20 µg	
Auswerter	I	II	I	II	I	II	I	II
	+-++	+	+-++	+	++	+++	++	++

Es wurde deutlich, dass die beiden Versuche mit der Färbeküvette konsistente Ergebnisse lieferten. Die Microspherekapillaren lagerten in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration Targetzellen gut an, während Kapillaren ohne Microspheres nur mit wenigen Zellen beladen waren.

Die Versuche mit der Säule dagegen lieferten bei sonst gleichen Versuchsbedingungen keine vergleichbaren Ergebnisse. Es fiel aber auf, dass die Kapillaren aus der Säule bei hoher Antikörperkonzentration massenhaft Zelltrümmer trugen. Weiter fiel auf, dass die vordere Rundung der Kapillare in einem eng umschriebenen Bereich mit einem dichten Rasen an Zellen besetzt war.

In der Diskussion dieser Beobachtungen kamen wir zu dem Ergebnis, dass die Schwerkraftverhältnisse während der Inkubation einen entscheidenden Einfluss auf die Anlagerung von Targetzellen spielen müssen.

Versuch V

Auf der Grundlage der im Versuch IV beschriebenen Beobachtungen wurde die Säule während des Inkubationsvorgangs auf 20° zur Horizontalen gekippt. Bei sonst gleichen Versuchsbedingungen wie in den vorangegangenen Experimenten lagerten die Kapillaren nun Targetzellen in hohem Masse an. Die Anlagerung erfolgte in der unteren Hälfte der Zirkumferenz mit der höchsten Zelldichte, an den seitlichen Bereichen der Kapillaren waren weniger Zellen gebunden. Darüber wurde, von mortalen Zellen und Zelltrümmern abgesehen, keine Anlagerung beobachtet.

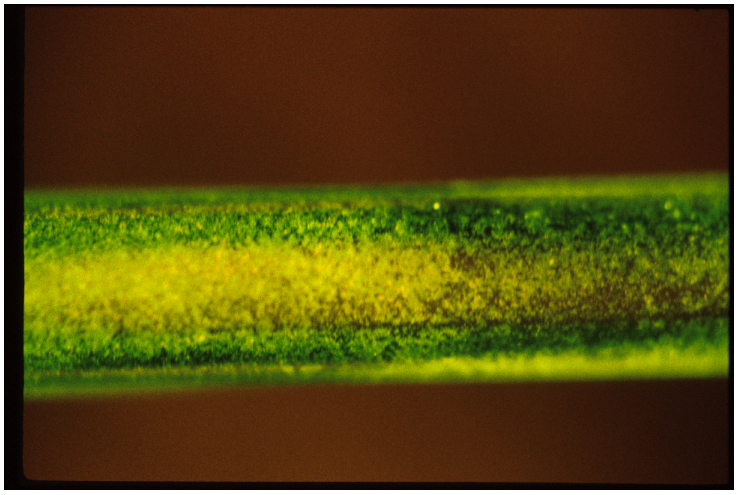


Abbildung 8

Hier zeigt sich das typische Verteilungsmuster mit Zellkonzentration an den abhängenden Partien der Kapillare. Die Grünfluoreszenz zeigt vitale Zellen an

Die Ablösung der adhärenten Zellen erfolgte mittels Einbringung der Kapillare in eine Laborpipette und Erzeugung einer starken Strömung mit anschliessender Zentrifugation der Zellsuspension und Resuspension in 600 µl BSA Lösung. Die Zellzählung erfolgte bei nunmehr ausreichender Zellkonzentration in einem Coulter Zellzählgerät.

Tabelle 7: Zellbesatz der Kapillaren und automatisierte Zellzählung in Ablösesuspension

Beurteilung des Zellbesatzes auf Kapillaren vor und nach Ablösung. Die Zellzählung in der Recovery- (Ablöse-) Suspension erfolgte durch automatisierte Auszählung.

Viabilität der Zellen auf der Kapillare vor Ablösung > 90%. Nach Ablösung nur noch mortale Zellen auf der Kapillare sichtbar

	Amin geblockt				**Microspheres geblockt**			
Ak-Konzentration	20 µg		50 µg		20 µg		50 µg	
Zellkonz. (Coulter)	500 /µl		0 / µl		600 / µl		0 / µl	
Zeitpunkt	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach
Ergebnis Mikroskop	+++	++-+++	+++	+++	+++	++-+++	+++	+++

Obwohl in diesem Experiment zu ersten Mal ausreichend Zellen abgelöst werden konnten, zeigte die Mikroskopie nach Ablösung noch erhebliche Zellmengen an den Kapillaren. Aufgrund der Tatsache, dass die auf der Kapillare verbliebenen Zellen avital waren, wurde auf eine weitere Erhöhung der mechanischen Kräfte zur Ablösung verzichtet.

Aus diesem Experiment wird deutlich, dass die Ablösbarkeit der Targetzellen in Beziehung zur Antikörperkonzentration steht. Die folgenden Versuche beschäftigten sich mit der Frage, wie die Ablösbarkeit verbessert werden kann.

Abbildung 9 auf der folgenden Seite zeigt die Fluoreszenz von Zellen auf einer Kapillare nach dem Ablöseverfahren von Versuch V.

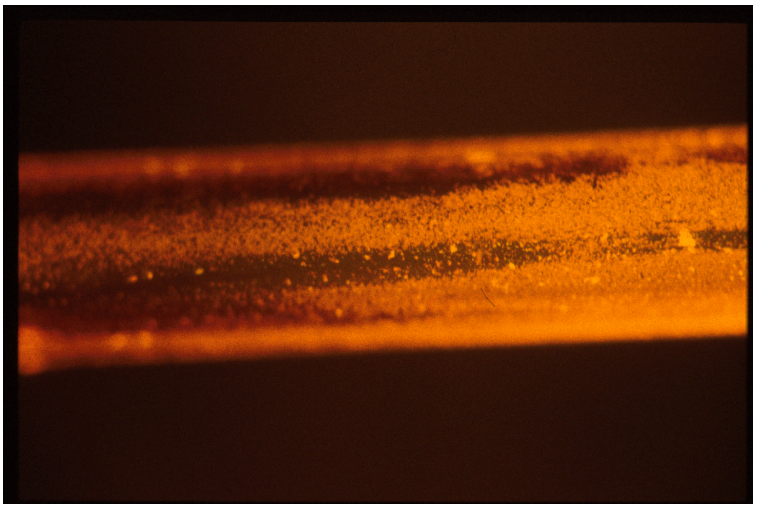


Abbildung 9

Avitale Zellen erkennbar an rot fluoreszierenden Kernen im Anschluss an einen mechanischen Ablösevorgang

Versuch VI

Der Versuch musste vorzeitig wegen Klumpung der MNC Fraktion abgebrochen werden.

Versuch VII

In diesem Versuch wurde geprüft, ob ältere Kapillaren einen Aktivitätsverlust erleiden, bzw. ob die Lagerungsdauer von antikörperbeladenen Kapillaren über 4 Wochen einen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit hat. Die als `frisch´ bezeichneten Kapillaren waren am Vortag mit Antikörper vorbehandelt worden.
Tabelle 8 auf der folgenden Seite gibt das Ergebnis wieder.

Tabelle 8: **Mikroskopie der Kapillaren auf Zellbesatz vor und nach Ablöseversuch**

Färbung mit Ethidiumbromid/ Acridinorange. Als Negativkontrolle dient eine völlig unbehandelte Glaskapillare, sowie eine Glaskapillare, welche alle Inkubationsschritte bis auf die Inkubation in Antikörper durchlaufen hat

	Microspheres geblockt frisch						**Glas**			
Ak-Konz	IgM 50µg/ml		IgG 50µg/ml		Wö 50µg/ml		0 µg/ml		unbehandelt	
Zeitpunkt	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach
	+++	++	++	+	0	0	+	0-+	++-+++	0-+
	Microspheres geblockt gelagert									
Ak-Konz	IgM 50µg/ml		IgG 50µg/ml		Wö 50µg/ml					
Zeitpunkt	vor	nach	vor	nach	vor	nach				
	+++	++-+++	++-+++	+-++	++	+-++				

Es wurde deutlich, dass durch die Lagerung der mit Campath-Ak inkubierten Kapillaren kein merklicher Aktivitätsverlust stattfand. Anhand der mitgeführten Glaskapillare konnte noch einmal gezeigt werden, dass das verwendete Blockierungverfahren unspezifische Bindung weitgehend unterdrückte.

Versuchsreihe VIII

In Fortführung der Überlegungen zur Verbesserung der Ablösbarkeit aus Versuch VII wird in den folgenden Versuchen dieser Versuchsreihe mit unterschiedlichen Antikörpertypen- und Konzentrationen, sowie verschiedenen Chargen der Kapillaren experimentiert.

Die genannten Variationen der Versuchsbedingungen wurden unter Konstanthaltung aller übrigen Parameter entsprechend denen aus Versuchsreihe III beschriebenen durchgeführt. Die Vorbereitung der Kapillaren in Antikörper- und Blockierungslösungen, sowie die Inkubation in Zellsuspension und insbesondere die Ablösemethode war für alle auf III folgenden Versuche identisch.

Tabelle 9: **Mikroskopie auf Zellbesatz vor und nach Ablöseversuch unter Variation der Antikörper- konzentration**

Die Vorbereitung der Kapillaren erfolgte unter Variation der Antikörperkonzentration von Campath IgG und IgM Antikörper. Die Buchstaben n- und a- vor den Kapillartypen stehen für alt (4 Monate alte Kapillaren) bzw. neu (neu aus Israel eingetroffene Kapillaren). Die Zellzählung in der Ablösesuspension wird im automatischen Zellzähler durchgeführt

	n-Microspheres geblockt							
Antikörper	IgG 5µg/ml		IgG 10µg/ml		IgM 5µg/ml		IgM 10µg/ml	
Zellzahl	0,6/nl		0,5/nl		1,8/nl		0,4/nl	
Zeitpunkt	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach
Auswertung	+	0-+	++	+	++	+-++	+++	+

	a-Microspheres geblockt							
Antikörper	IgG 5µg/ml		IgG 10µg/ml		IgM 5µg/ml		IgM 10µg/ml	
Zellzahl	1,5/nl		1,2/nl		0,9/nl		0,9/nl	
Zeitpunkt	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach
Auswertung	+-++	+	+++	+	+++	0-+	+++	0

	Microspheres							
Antikörper	IgG 5µg/ml		IgG 10µg/ml		IgM 5µg/ml		IgM 10µg/ml	
Zellzahl	0,4/nl		0,6/nl		0,8/nl		0,2/nl	
Zeitpunkt	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach
Auswertung	+-++	0	++	+	++-+++	+	+++	+

	n-Amin geblockt							
Antikörper	IgG 5µg/ml		IgG 10µg/ml		IgM 5µg/ml		IgM 10µg/ml	
Zellzahl	0,1/nl		0/nl		0/nl		0/nl	
Zeitpunkt	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach
Auswertung	+++	++	+++	++	++	++	+++	+++

	Amin							
Antikörper	IgG 5µg/ml		IgG 10µg/ml		IgM 5µg/ml		IgM 10µg/ml	
Zellzahl	0,6/nl		0,8/nl		0,2/nl		0,1/nl	
Zeitpunkt	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach
Auswertung	++	+-++	+++	++	++	++	+++	+++

	Glas							
Antikörper	IgG 5µg/ml		IgG 10µg/ml		IgM 5µg/ml		IgM 10µg/ml	
Zellzahl	0/nl		0,1/nl		0/nl		0/nl	
Zeitpunkt	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach
Auswertung	+	0	+++	+	+++	++	++-+++	++

Die mit Microspheres besetzten Kapillaren lieferten deutlich bessere Ergebnisse bezüglich der ablösbaren Zellen. Eine eindeutige Korrelation zwischen der Zahl abgelöster Zellen und der Antikörperkonzentration bzw. der Antikörpersubklasse konnte in diesem Experiment nicht gezeigt werden. Insbesondere bestand kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der mikroskopisch beobachteten Anzahl der angelagerten Zellen auf der Kapillare vor und nach Ablösung und der abgelösten Zellzahl. Bezüglich der Anlagerung bestand kein Unterschied zwischen neuen und 4 Monate alten Kapillaren,
Die Kapillaren wurden nach dem Ablösen in Ethidumbromid/ Acridinorange getaucht und mikroskopiert. Dabei fiel auf, dass sich fast ausschliesslich mortale Zellen sowie Zellreste auf der Kapillare fanden. Aus diesem Grund wurde auf weitere Ablöseschritten verzichtet.

Versuchsreihe IX

Die in dieser Versuchsreihe zusammengefassten Experimente beschäftigten sich mit der Spezifität des Selektionsverfahrens.
Nach Inkubation der Kapillaren in B- Zell Antikörper - anstelle von Campath – entsprach die übrige Vorgehensweise der aus den vorangegangenen Versuchen. Im Anschluss an das Ablöseverfahren erfolgte die Mikroskopie der Kapillaren. Die abgelösten Zellen wurden in anti-B-Zell Antikörper und anschließend in GAM-FTIC Sekundärantikörper inkubiert. Bei allen vier Versuchen der Reihe wurde die Zellkonzentration der Ablösesuspension in der Neubauer Zählkammer bestimmt. Als GAM-FTIC pos wurden die Zellen ausgezählt, welche eine positive Fluoreszenz zeigten und damit als B- Zellen zu identifizieren waren.
Als Negativ- Kontrolle wurde die MNC-Fraktion ohne B- Zellantikörper inkubiert und anschliessend typisiert.
Als Positiv- Kontrolle wurde die MNC-Fraktion mit B- Zellantikörper und anschliessend mit GAM - FTIC inkubiert und ebenfalls typisiert.
Zur Eingrenzung der Variabilität wurden 4 Versuchsansätze mit identischen Versuchsbedingungen durchgeführt. Die Färbung erfolgte mit Ethidiumbromid/ Acridinorange wie in den vorangegangenen Versuchen. Die jeweils zweite Kapillare durchlief den Ablöseprozess.

Tabelle 10: Ergebnisse der Immuntypisierung aus vier parallelen Ansätzen

In den vier Parallelversuchen zeigt sich kostant ein niedriges Verhältnis von FITC positiven zu FICT negativen Zellen in der Ablösesuspension als Ausdruck einer geringen Selektivität. Als Ak Konz. steht die Konzentration an B-Zell Antikörper in welcher die angegebenen Kapillarentypen vorbereitet wurden. Die Mikroskopie erfolgte im Anschluss an den Ablösevorgang und gibt semiquantitativ den Zellbesatz der Kapillaren wieder. Die Zellzahl wurde nach Nativmikroskopie im Phasenkontrast in der Neubauerkammer bestimmt.

Nach Zuschaltung des Fluoreszenzlichts erfolgte Auszählung der FITC positiven Zellen

Parallelansatz 1:

Kapillartyp	**Microspheres gebl**			**Amin geblockt**			**Glas**		
Ak Konz(µg/ml)	0	10	20	0	10	20	0	10	20
Mikroskopie	+	++	++	+	(+)	+	0	0	0
Zellzahl /nl	52	51	58	48	0	0	0	0	0
FITC pos	12	10	9	7	0	0	0	0	0

positiv Kontrolle: Zellzahl 61, davon pos 16

negativ Kontrolle: Zellzahl 121, davon pos 5

Parallelansatz 2:

Kapillartyp	**Microspheres gebl**			**Amin geblockt**			**Glas**		
Ak Konz(µg/ml)	0	10	20	0	10	20	0	10	20
Mikroskopie	(+)	+	++	(+)	++	+++	+	(+)	+
Zellzahl	0	104	102	0	116	96	0	0	0
FITC pos	0	24	20	0	18	14	0	0	0

positiv Kontrolle: Zellzahl 122, davon pos 32

negativ Kontrolle: Zellzahl 126, davon pos 5

Parallelansatz 3:

Kapillartyp	**Microspheres gebl**			**Amin geblockt**			**Glas**		
Ak Konz (µg/ml)	0	10	20	0	10	20			
Mikroskopie	(+)	++	++	(+)	++	+++			
Zellzahl	45	358	196	0	138	135			
FITC pos	5	62	49	0	41	6			

positiv Kontrolle: Zellzahl 217, davon pos 52

negativ Kontrolle: Zellzahl 117, davon pos 8

Parallelansatz 4:

Kapillartyp	**Microspheres gebl**			**Amin geblockt**			**Glas**		
Ak Konz(µg/ml)	0	10	20	0	10	20	0	10	20
Mikroskopie	0	+-++	++	+	++	+++	0	(+)	(+)
Zellzahl	0	154	146	0	106	86	0	0	0
FITC pos	0	32	28	0	15	16	0	0	0

positiv Kontrolle: Zellzahl 136, davon pos 42

negativ Kontrolle: Zellzahl 140, davon pos 4

Die Selektivität der Versuche war konstant gering. Das Verhältnis der FITC pos Zellen zu FITC neg Zellen entsprach dem Verhältnis aus der Ursprungszellsuspension, welche als positiv- Kontrolle mitgeführt wurde. Da auf der Grundlage der vorangegangenen Versuche die unspezifische Bindung in grossem Massstab als Ursache auszuschliessen war, muss davon ausgegangen werden, dass das Ablöseverfahren zum grösseren Teil die unspezifisch gebundenen Zellen ablöst, die spezifisch gebundenen dagegen trotz des vergleichsweise aggressiven Ablöseverfahrens nicht abgelöst werden konnten und auf der Kapillare verblieben. Zur experimentellen Klärung dieser Vermutung dienten die in der folgenden Versuchsreihe durchgeführten Experimente.

Versuchsreihe X

In diesem Versuch wurden Kapillaren mit adhärenten Zellen der Immuntypisierung unterzogen. Je zwei Kapillaren vom Typ `Microspheres mit geblockten Amingruppen ´, `Amin mit geblockten Amingruppen´ und `Glas´ wurden wie im vorangegangenen Versuch vorbereitet und wie im Methodenteil beschrieben immuntypisiert.
Die Auszählung auf der runden Kapillare warf jedoch Schwierigkeiten auf. Die in Tabelle 11 wiedergegebenen Ergebnisse wurden nach Auflegen der Kapillare auf ein Mykrometerraster auf 4µm^2 ausgezählt.

Tabelle 11: FITC negativ / FITC positiv gilt als Kriterium für die Selektivität.

Die Typisierung und anschließende Auszählung von an der Kapillare adhärenten Zellen ergibt ein deutlich anderes Bild wie die Typisierung von abgelösten Zellen in zwei paralellen Ansätzen.
Zellzahl steht hier für Zellbesatz der Kapillaren nach Inkubation. Die Mikroskopie erfolgte im Phasenkontrast sowie mit Fluoreszenzlicht. Die untere Zeile der Tabelle gibt nach Fluoreszenzmarkierung (mittels GEM-FITC Ak) der in B-Zell Antikörper inkubierten Kapillaren das Verhältnis von FITC negativ zu FITC positiv Zellen auf der Kapillaroberfläche wieder

Parallelansatz 1:

Kapillartyp	**Microspheres gebl.**			**Amin geblockt**			**Glas**		
Ak Konz	0	10	20	0	10	20	0	10	20
Zellzahl	0	++	+++	0	+	++	0	0	0
FITC neg/pos		4/32	3/42		4/10	9/31			

Parallelansatz 2:

Kapillartyp	**Microspheres gebl.**			**Amin geblockt**			**Glas**		
Ak Konz	0	10	20	0	10	20	0	10	20
Zellzahl	(+)	++	++	0	0	+++	0	0	0
FITC neg/pos		2/28	4/52			8/32			

Die Auszählung zeigte eine deutliche Überzahl der FTIC- positiven Zellen. Dies gilt für die Microspheres tragenden Kapillaren ebenso wie für die Kapillaren mit geblockten Aminen.

Die Vermutung, dass die Ablösung spezifisch gebundener Zellen mit mechanischen Mitteln nicht in ausreichendem Masse möglich war, konnte damit als bestätigt angesehen werden.

Bemerkenswert erschien, dass auch in den Versuchen IX und X die Kapillaren mit geblockten Aminen eine große Zahl Zellen anlagerten. Die Zellbindung korreliert mit der Antikörperkonzentration in der die Kapillaren vorbereitet worden waren. Als Schlussfolgerung liegt daher nahe, dass Amingruppen auch in ihrer geblockten Form zu Interferenzen mit Antikörpern und Zellen neigen.

Welchen Anteil die Amingruppen an der unbefriedigenden Ablösung haben und zu welchem Anteil die Microspheres dafür verantwortlich sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden. Die möglichen Ursachen werden im Abschnitt Diskussion weiter besprochen.

4 Zusammenfassung der Ergebnisse

4.1 Erkenntnisse aus den Versuchen zur Proteinbindung

In den dargestellten Versuchen konnte gezeigt werden, dass es auf der Grundlage der Fluoreszenzmikroskopie möglich ist, die Proteinbindung an unterschiedliche Oberflächen zu visualisieren. Mit Hilfe von floureszenzmarkierten Antikörpern wurden so die Bindungseigenschaften von Antikörpern an unterschiedliche Oberflächen und die Bindung von Sekundärantikörper an primär gebundene Antikörper untersucht.
Es wurde deutlich, dass sich die Bindung von Antikörpern an Oberflächen durch die Vorinkubation dieser Oberflächen in Proteinlösung wirksam blockieren lässt:

Für die untersuchten Kapillaren mit kovalent gebundenen Microspheres zeigt sich, dass die Bindungsvalenzen bei einer Inkubationsdauer von 2 Stunden nicht zuverlässig genug geblockt werden konnten. Im Falle dieser Kapillaren führte eine Inkubationszeit von 12 Stunden zu einer vollständigen und nachhaltigen Blockierung der Bindungsvalenzen.

Unter pH Modulation wurden Antigen- Antikörperbindungen instabil und es kam zur Ablösung des Antikörpers. Es konnte gezeigt werden, dass sich sekundär gebundener Antikörper unter pH Absenkung wieder von den Kapillaren waschen liess. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Bindung von Sekundärantikörpern tatsächlich dem angenommenen Modell entsprach.

4.2 Klumpung des Zellmaterials

Zu Beginn der Versuche mit Zellen war es häufig zu Problemen mit der Vorbereitung und Behandlung von Zellsuspensionen gekommen. Ausdruck fand diese in der makroskopisch sichtbaren Klumpung des Zellmaterials vor oder während der Inkubation. Teilweise war die Klumpung erst bei der mikroskopischen Untersuchung in Form von Zelltrauben auf den Kapillaren deutlich geworden.

Zur Vermeidung der mechanischen Zellschädigung war daher das Durchmischungsverfahren mehrfach variiert worden: Nach anfänglicher Durchmischung in Laborröhrchen auf dem Taumelschüttler war dann der Bellydancer eingesetzt worden. Wegen der relativ hohen Strömungsgeschwindigkeiten beim Kippen der Laborröhrchen auf dem Schüttler war für das Inkubationsverfahren eine Färbeküvette verwandt worden. Schließlich wurde eine fast laminare Strömung durch Verwendung einer selbstgebauten Säule erreicht und so die Ursachen der mechanische Zellschädigung weitgehend vermieden.
Neben der genannten mechanischen Schädigung haben plasmatische und zelluläre Gerinnungsprobleme zur Klumpung beigetragen.
Um die Aktivierung der Gerinnungskaskade durch verbliebene Plasmaanteile zu vermeiden, wurde den Zellsuspensionen EDTA zugesetzt. Zur Verhinderung der Klumpung durch Thrombozyten wurde zu einer thrombozytenarmen Präparation des mononukleären Zellmaterials übergegangen.
Unter Einhaltung aller oben beschriebenen Maßnahmen ist es danach zu Problemen mit Klumpung nicht mehr gekommen.

4.3 Unspezifische Bindungen

Das Problem der unspezifischen Bindung war im Verlauf der Arbeit in vielfältiger Form aufgetreten.
So lagerten die Glasoberflächen der Kapillaren Antikörper an. Die so an der Glasoberfläche haftenden Antikörper haben ihrerseits wieder zur Bindung von Zellen geführt. Ebenso fiel auf, dass unbehandelte Glasoberflächen direkt zur Zellbindung führten.

Analog zur unspezifischen Bindung von Zellen an die Glasoberflächen der Kapillaren war es zur Anlagerung von Antikörpern und Zellen an die im Versuch verwandten Glas- und Kunststoffoberflächen gekommen.
Wie bereits im Abschnitt über die Proteinbindung ausgeführt, war das Blockierungverfahren zur Vermeidung von unspezifischer Bindung mehrfach verändert worden.
Als ausreichende Blockierung aller Oberflächen hat sich die Inkubation in 0,5% BSA für 12 Stunden erwiesen.

Ein weiteres Problem mit unspezifischer Bindung war durch die Verwendung von Kapillaren aufgetreten, die an ihrer Oberfläche freie Aminreste trugen. Aus diesem Grund wurden zwei weitere Kapillartypen eingeführt, deren oberflächliche Amingruppen chemisch inaktiviert waren. Es konnte gezeigt werden, dass durch die neu eingeführten Kapillarenarten die unspezifische Bindung von Antikörpern deutlich vermindert werden konnte.
Dagegen war es in den Versuchen mit Zellsuspensionen trotz ausreichender Blockierung mit Proteinlösung konstant zur Bindung von Zellen an die Kapillaren mit geblockten Aminen gekommen. Die Vermutung, dass die Amingruppen auf der Kapillarenoberfläche auch in geblockter Form weiterhin mit Antikörpern interferieren oder direkt zur Anlagerung von Lymphozyten führen liegt daher nahe.

4.4 Verfahren der Erfolgskontrolle und Recovery

Die anfangs durchgeführten Verfahren zur Ablösung der Zellen - Zentrifugation, Bewegen der Laborröhrchen von Hand, Zytozentrifugation, Abrollen der inkubierten Kapillaren auf dem Objektträger - führten nicht zu befriedigenden Ergebnissen.

Deshalb wurden im Rahmen der Vorversuche zwei chemische Verfahren angewandt:

1. Die pH- Modulation führte nicht in allen Fällen zu dem gewünschten Erfolg.
2. Die Ablösung durch 1% Tritonlösung führte bei allen untersuchten Kapillarentypen zu einer nahezu vollständigen Reinigung der Kapillaren von allem Zellmaterial. Die Mikroskopie der Ablösesuspension ergab eine große Menge an Zellfragmenten und Zellklumpen. Intakte Zellen waren nicht beobachtet worden. Das Verfahren wurde daher nicht weiterverfolgt.

Letztendlich wurden die zur Ablösung erforderlichen Scherkräfte in Laborpipetten erzeugt, indem die Kapillaren in den Hals der Pipette aufgenommen und dann durch Aspirieren und Exprimieren der Pipette gespült wurden. Mit diesem vergleichsweise aggressiven Waschverfahren war eine ausreichend hohe Recovery möglich, um die Ablösesuspension der Messung im automatischen Zellzähler zugänglich zu machen.

4.5 Viabilität

Die Visualisierung der Zellbindung an Kapillaren sowie der abgelösten Zellen in Suspension erfolgte ab Vorversuch j mittels Ethidiumbromid/ Acridinorange.
Mit Ausnahme der Abrollmethode war bei den mechanischen Ablösemanövern nur eine geringe Zellmortalität in der Ablösesuspension gefunden worden. Ebenfalls war der Anteil der nicht vitalen Zellen bei direkter Mikroskopie der Kapillaren nach Inkubation konstant unter 10%. Die Mikroskopie der Kapillaren nach einem mechanischen Ablösemanöver ergab fast ausschliesslich tote Zellen auf den Kapillaren.
Die pH-Modulation hat zu keiner offensichtlichen Änderung des genannten Verhältnisses viabler/ nicht viabler Zellen geführt.
Der Kontakt mit Triton führte jedoch bei fast vollständiger Ablösung zur weitgehenden Zerstörung des Zellmaterials.

4.6 Spezifität der Zellselektion

Die Versuche zur Spezifität der Zellselektion durch Polyacrolein- Microspheres wurden mit B-Zell-Antikörper durchgeführt.
Es war erwartet worden, dass die nach Inkubation von den Kapillaren abgelöste Zellsuspension einen hohen Anteil von positiv selektionierten Zellen enthält. Allerdings wurde deutlich, dass die Ablösesuspension in keinem Falle als Positiv- Selektion zu werten war. Aus den errechneten Verhältniszahlen ergab sich im Gegensatz zum erwarteten Ergebnis ein leicht geringerer Anteil an positiv selektionierten Zellen.
Es war daher anzunehmen, dass der Anteil der abgelösten Zellen vorwiegend aus unspezifisch gebundenem Material bestand, während die spezifisch gebundenen Zellen weiterhin an den Kapillaren adhärent blieben.
Die Gegenprobe wurde im zweiten Schritt durch Immuntypisierung jener Zellen unternommen: Hier wurde wiederum in allen Ansätzen deutlich, dass der grösste Teil der positiv selektionierten Zellen noch auf der Kapillare zu finden war.
Das oben beschriebene Ablöseverfahren war also nicht ausreichend, um Zellen von den Microspheres zu lösen.

4.7 Fazit

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es im Rahmen meiner Arbeit gelungen ist, eine Reihe von Vorbedingungen zu schaffen, welche für die Selektion von Targetzellen aus einem Zellpool günstig sind.

Die Bindungseigenschaften von Microspheres tragenden Glaskapillaren und verschiedener Intermediärprodukte derselben wurden eingehend untersucht und optimiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Zellen an adäquat präparierte Kapillaren einem gravitationsabhängigen Muster folgt und weitgehend spezifisch ist. Aufgrund von Ablöseproblemen ist es nicht gelungen, die für die für Zellselektion üblichen Qualitätskriterien zu erreichen.

5 Diskussion

Wie in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, konnten Margel et al. anhand ihrer Experimente mit Blutplasma und Vollblut zeigen, dass Polyacrolein- gebundene Antikörper in der Lage sind, spezifisches Antigen wie z.B. Autoantikörper anzulagern. Die Wirksamkeit dieses Purgingvorgangs konnte in vorklinischen Experimenten gezeigt werden.

Im Zuge der Entwicklung von Positiv- Selektionsmethoden für zelluläre Blutbestandteile lag daher die Annahme nahe, dass ein wirksames Purgingverfahren für Plasmabestandteile auch für die Positiv- Selektion von Blutzellen geeignet wäre. Der Inhalt der vorliegenden Arbeit war daher, diesen Analogieschluss auf seine Richtigkeit zu prüfen.

5.1 Die Bearbeitung der „technischen“ Aspekte

Im Rahmen meiner Arbeit wurde ein Verfahren für die Verarbeitung von mononukleären Zellen entwickelt, welches für die Anlagerung von Zellen an Kapillaren- gebundene Microspheres günstige Bedingungen bot:
Diese Bedingungen betreffen die zelluläre Zusammensetzung sowie die Zelldichte der Suspension ebenso wie die Optimierung der gelösten Bestandteile.
Es wurde eine Reihe technischer Aufbauten erprobt, bis zuletzt eine selbstgebaute Säule gute Ergebnisse für die Anlagerung von Zellen an die Kapillaren lieferte.
In der Vorbereitung der Kapillaren wurden Bedingungen definiert, welche die unspezifische Bindung von Proteinen deutlich verminderten und gleichzeitig über eine Optimierung der Antikörperkonzentration eine ausreichende Zellbindung gewährleisteten.
Im Rahmen der Photodokumentation konnten Beobachtungen bezüglich der Anlagerungscharakteristika von Targetzellen an Kapillaren gemacht werden, die Rückschlüsse auf den Einfluss der Schwerkraft auf die Antikörper- Zellbindung zulassen.

5.2 Die Vergleichbarkeit mit bereits existierenden Verfahren

Wie in der Einleitung besprochen, existierten zum Zeitpunkt der beschriebenen Experimente bereits eine Reihe von erprobten und zum Teil kommerziell erhältlichen Verfahren zur Positiv- Selektion von Zellen aus dem Blut. Jedes neu entwickelte Verfahren sollte sich daher an den existierenden Standards orientieren. Hieraus ergeben sich folgende Qualitätsmerkmale für die Positivselektion:

1. Spezifität der Bindung von Targetzellen an den Vektor
2. Viabilität der positiv selektionierten Zellen
3. Recovery der positiv selektionierten Zellen vom Gesamtpool an Target-zellen
4. Rasche Verarbeitungszeit des Zellmaterials
5. Einfachheit der Einhaltung von sterilen Kautelen

In der Versuchsreihe zur *Spezifität* konnte gezeigt werden, dass die Kapillaren- gebundenen Zellen weitgehend spezifisch gebunden waren. Hier ist das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren in der Effizienz mit den kommerziell verfügbaren Verfahren vergleichbar. Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass es in keinem der Versuche gelungen ist, viable Zellen vollständig von der Kapillare zu lösen. Eine Selektivität bei der Untersuchung der Ablösesuspension konnte nicht gezeigt werden.

Die *Viabilität* der Zellen auf der Kapillare nach ist Abschluss des Inkubationsvorgangs deutlich über 90%. Im Anschluss an den Ablösevorgang finden sich in allen Ablösesuspensionen gleichermaßen ein hoher Prozentsatz an viablen Zellen.
Einschränkend hierzu muss vermerkt werden, dass nur ein geringer Teil der adhärenten Zellen aus der Bindung an die Kapillare gelöst werden konnte. Die nach mechanischer Ablösung auf der Kapillare verbliebenen Zellen sind avital. Gleiches gilt für diejenigen Zellen, welche mittels eines Detergens von den Kapillaren gelöst werden konnten.

Eine Beurteilung der *Recovery* war mit den in der Arbeit zur Verfügung stehenden Mitteln insgesamt nicht zu realisieren. Grund dafür war das Größenverhältnis zwischen zu selektierendem Zellpool und Kapillaroberfläche. Die zu Versuchszwecken produzierten Microspheres- besetzten Kapillaren boten für die Anlagerung eines messbaren Anteils aus dem Zellpool nicht ausreichend Bindungskapazität.

Aufgrund der genannten Sachverhalte wurde die Recovery nicht untersucht. Stattdessen wurde der Anteil von positiv- selektierten Zellen bestimmt. Dies erfolgte in der Mehrzahl der Experimente durch Auszählung nach Immuntypisierung in der Suspension der abgelösten Zellen. Da auf diesem Weg jedoch keine positive Selektivität gezeigt werden konnte, wurden die Zellen auf der Kapillare immuntypisiert. Hier zeigte sich ein positives Selektionsergebnis.

In keinem Experiment war es gelungen, viable selektionierte Zellen in ausreichendem Masse abzulösen. Neben einer Vielzahl mechanischer Methoden wurde mit pH-Modulation und Detergens experimentiert.
Für die Ablösung der Zellen wären andere kommerziell erhältliche Methoden in Frage gekommen wie z.B. die enzymatische Ablösung mit Trypsin oder Chymotrypsin sowie die Ablösung mit dem kommerziell erhältlichen Sekundärantikörper Detach-a-beat (Dynal). Diese Systeme wurden jedoch in der Arbeit nicht untersucht.
Der Umstand, dass eine pH- Modulation die Ablösung nicht beeinflussen konnte, stellt außerdem, wie weiter unten im Text diskutiert, die Erfolgsaussicht chemischer Manipulationen in Frage.

Nach Einführung der selbstgebauten Säule in den Versuchsaufbau konnte eine *rasche Verarbeitung des Zellmaterials* und der Spülungslösungen verwirklicht werden. Aufwendiges Ein- und Auspipettieren erübrigte sich, ebenso Leerlaufzeiten wegen der Durchführung von Zwischenschritten. Ohne Berücksichtigung der Inkubationszeit für das Zellmaterial lag die Verarbeitungszeit bei etwa 45 Minuten.

Die Einhaltung steriler Kautelen war ebenfalls nach Einführung der selbstgebauten Säule deutlich erleichtert. Das System war in sich geschlossen und hatte nur während Befüllung und zum Wechsel der Lösungen und Suspensionen an den Schlauchenden der Einfüllstutzen Kontakt zur Außenwelt.

Unter Berücksichtigung aller oben genannten Qualitätskriterien lässt sich zusammenfassend sagen, dass im Rahmen meiner Experimente *nicht* gezeigt werden konnte, dass Polyacrolein- Microspheres ein geeignetes Mittel zur Positivselektion von peripheren Blutzellen darstellen. Gründe für diese insgesamt negative Zusammenschau werden im Folgenden diskutiert.

5.3 Kritische Betrachtung der Untersuchungsbedingungen und Durchführung der Arbeit

Die Untersuchung eines Verfahrens für einen bisher vollständig unerprobten Einsatz wie den der Zellselektion im Rahmen einer zeitlich begrenzten medizinischen Dissertation ist insgesamt kritisch zu sehen. Bereits zum Zeitpunkt meiner ersten Arbeiten mit Microspheres existierten markteingeführte Verfahren, welche an die Entwicklung einer konkurrierenden Methode hohe Ansprüche stellten.
Bereits zu Beginn der Arbeit stellten sich Schwierigkeiten bei der Verarbeitung von Zellmaterial ein, welche eine vorausgehende Klärung der Bindungsvorgänge auf der Ebene der Proteinbindung verlangten. Erst im Anschluss daran konnte zu Versuchen mit Zellmaterial zurückgekehrt werden.
Der quantitativen Auswertung des Selektionsprozesses stand entgegen, dass die nach Inkubation adhärenten Zellen nicht in ausreichendem Masse ablösbar waren. Trotz der Testung einer Vielzahl von Ablösemethoden war es erst zum Ende der Arbeit hin gelungen ausreichend Zellen für die Zellzählung zu gewinnen. Bis zu diesem Zeitpunkt konnten die Ergebnisse nur in semiquantitativer Form protokolliert werden. Ebenso konnten die Versuche mit Fluoreszenz Antikörpern nur semiquantitativ ausgewertet werden.
Trotz der genannten Vielzahl der versuchten Ablösetechniken sind im Rahmen der Arbeit weitere Methoden unversucht geblieben. Insbesondere hätte sich *die Variation der Antikörper* für die Immunoadhärenz möglicherweise günstig auf den Ablöseprozess auswirken können.

Der Einsatz des kommerziell erhältlichen „Ablöseantikörpers“ Detach-a-Beat® sowie enzymatische Ablösetechniken hätten möglicherweise zu einer Verbesserung des Ablöseergebnisses führen können.
Neben der zeitlichen Limitierung der Arbeit war für die genannte Beschränkung der Versuchsinhalte und insbesondere bezüglich Bereitstellung von diversen Antikörpern die Budgetierung entscheidend.
In diesem Zusammenhang sollte jedoch auch angemerkt werden, dass vor dem Hintergrund der guten Ablöseergebnisse des CELLector®- Systems von Cellpro mit einfachen mechanischen Mitteln die Rückkehr zu aggressiven enzymatischen bzw. teuren immungestützen Methoden obsolet erschien.
Insgesamt betrachtet hätte rückblickend mehr Augenmerk auf die Verbesserung des Ablösevorgangs gelegt werden können. Die Immunfluoreszenzuntersuchungen und besonders deren technisch aufwendige und wenig erfolgreiche Fotodokumentation hätte ich ohne große Abstriche im Ergebnis knapper halten können.
Angesichts des Gesamtumfangs des Themas wäre die Zusammenarbeit mit einem Doktorantenkollegen wünschenswert gewesen.

5.4 Kritische Betrachtung des Untersuchungsmaterials „Microspheres“

Das von Shlomo Margel erprobte Modell der spezifischen Bindung von Plasmaantikörpern durch Microspheres lässt sich aus einer Reihe von theoretischen Überlegungen und experimentell begründeten Tatsachen nicht auf die Bindung von Zellmaterial übertragen.

Die *Antikörperbindung ist homogen während die Zellbindung dem Einfluss der Schwerkraft unterliegt.*
Im Unterschied zur homogen verteilten Fluoreszenz von spezifisch gebundenem Sekundärantikörper an der Kapillare konnte gezeigt werden, dass sich spezifisch gebundenes Zellmaterial ausschließlich an den abhängenden Partien der Kapillarenzirkumferenz findet. Die vertikalen und oberen Anteile einer horizontal gelagerten Kapillare lagern Zellen nicht an. Es ist daher anzunehmen, dass Scherkräfte als Resultierende der Schwerkraft das Bindungsverhalten von Zellen an spezifischem Antikörper entscheidend beeinflussen.

Keine vermehrte Bindungsfläche durch Oberflächenvermehrung

Der Hersteller der Microspheres hatte auf die Vergrößerung der Bindungsfläche von Polyacrolein auf der Grundlage der Kugeloberfläche der Microspheres hingewiesen. In den von ihm durchgeführten Experimenten zur spezifischen Anlagerung von Plasmaantikörpern ist dieser Umstand von großer Bedeutung. Bei der Anlagerung von Zellen dagegen sind die Größenverhältnisse von Microspheres zu Blutzellen nicht geeignet, um die Anlagerungsfläche effektiv zu vergrößern. Tatsächlich ist davon auszugehen, dass Kapillaren, welche mit Polyacrolein auf einfache Weise beschichtet sind, effektiv dieselbe Oberfläche für Zellanlagerung böten wie Microspheres- Kapillaren.

Unterschiedliche Bindungscharakteristika von Zellen verglichen mit Antikörpern

Neben dem oben beschriebenen Einfluss der Schwerkraft auf die Bindung von Zellen werfen die Experimente die Frage nach weiteren Bindungskräften auf. Es konnte experimentell gezeigt werden, dass sich Antikörper, welche über eine Antigen- Antikörperbindung an Microspheres gekoppelt sind, über pH- Modulation vollständig aus ihrer Bindung lösen und auswaschen lassen. Im Unterschied dazu hat die pH- Modulation bei der Ablösung spezifisch gebundener Zellen zu keinem fassbaren Ergebnis geführt. Insbesondere vor dem Hintergrund der Ergebnisse mit paramagnetischen Nanobeats (MACS®), wo gezeigt werden konnte, dass Targetzellen die Partikel inkorporieren (36), stellt sich die Frage, ob auch Polyacrolein- Microspheres von Immunzellen nach spezifischer Oberflächenbindung inkorporiert werden. Dieses Modell wäre einerseits in der Lage zu erklären, warum die Ablösung der spezifisch gebundenen Zellen unter zellschonenden Bedingungen fehlschlägt, andererseits würde es erklären, warum die Ablösung mit aggressiven mechanischen Verfahren bzw. der Einsatz von Triton zum massenhaften Zelltot führt: In beiden Fällen läge dann wohl eine Zellwandschädigung vor, die eine Ablösung ermöglicht, jedoch mit dem Überleben der Zelle unvereinbar ist.

Bindungsaktivität von Amingruppen

Die Beschichtung der Kapillaren mit Amingruppen beeinflusst das Bindungsverhalten von Zellmaterial. Im Verlaufe der Arbeit war von Margel ein Kapillartyp zur Verfügung gestellt worden, auf dessen Oberfläche die aktiven Amingruppen geblockt waren.

Wie in der Mehrzahl der mit geblockten Amingruppen durchgeführten Versuche deutlich wurde, lagen die genannten Kapillaren dennoch Zellmaterial an.
Es liegt daher der Schluss nahe, dass die Blockierung der Amingruppen nicht suffizient ist. Möglicherweise spielen bei der Anlagerung von Zellen Bindungskräfte eine Rolle, die einerseits von der direkten Wirkung der Amingruppen auf die Zellmembran herrühren, andererseits Antikörper- vermittelt sind oder eine Kombination aus beiden Faktoren darstellen. Auf die Klärung der molekularen Ursachen dieses Phänomens konnte im Rahmen der Arbeit nicht eingegangen werden.

5.5 Schlussbemerkung

Es soll abschließend noch einmal betont werden, dass die getroffenen Aussagen und Annahmen nur auf der Grundlage der vorliegenden Versuchsergebnisse getroffen werden können. Weiterführende Versuche zur Untersuchung und Verbesserung insbesondere des Ablösevorgangs sind, wie in dieser Diskussion angesprochen, durchaus denkbar. Ob sich jedoch Verbesserungen an diesem kritischen Punkt des Verfahrens verwirklichen lassen, bleibt fraglich.

Meine eigene Ansicht ist, dass das Verfahren der Zellselektion mit Microspheres einen erfolglosen Versuch in der Geschichte der Entwicklung der Stammzell-selektion darstellt.

6 Zusammenfassung der Arbeit

Polyacrolein Microspheres, entwickelt von Margel et al sind aufgrund aktivierter Aminreste auf ihrer Oberfläche in der Lage jede Form von Protein kovalent zu binden. Diese Bindung, eine Schiff'sche Base, kann daher Antikörper dauerhaft immobilisieren, ohne die spezifischen Bindungseigenschaften des Antikörpers zu beeinflussen. Der Antikörper kann seinerseits der Fab- Region entsprechendes Antigen immobilisieren. Die so entstandene Antigen- Antikörperbindung ist reversibel.
Margel et al. konnten anhand ihrer Experimente mit Blutplasma und Vollblut zeigen, dass Polyacrolein- gebundene Antikörper in der Lage sind spezifisches Antigen wie z.B. Autoantikörper anzulagern. Die Wirksamkeit dieses Purgingvorgang konnte in vorklinischen Experimenten gezeigt werden.
Im Zuge der Entwicklung von Positiv- Selektionsmethoden für zelluläre Blutbestandteile lag die Annahme nahe, dass ein wirksames Purginverfahren für Plasmabestandteile auch für die Positiv- Selektion von Blutzellen geeignet wäre. Der Inhalt meiner Arbeit war daher diesen Analogieschluss auf seine Richtigkeit zu prüfen.
Im Rahmen meiner Arbeit war ein Verfahren für die Verarbeitung von mononukleären Zellen entwickelt worden, welches für die Anlagerung von Zellen an kapillarengebundene Microspheres günstige Bedingungen bot:
Diese Bedingungen betreffen die zelluläre Zusammensetzung sowie die Zelldichte der Suspension ebenso wie die Optimierung der gelösten Bestandteile.
Mittels Immunfluoreszenz- Verfahren wurde das Bindungsverhalten der Kapillaren für Protein untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Polyacrolein- Microspheres Antikörper irreversibel binden. Der so gebundene Antikörper ist seinerseits in der Lage Sekundärantikörper spezifisch an den Kapillaren zu immobilisieren. Diese Bindung ist reversibel.
Für die Inkubation von Zellmaterial wurde eine Reihe technischer Aufbauten erprobt, bis zuletzt eine selbstgebaute Säule gute Ergebnisse für die Zellanlagerung lieferte. Ebenfalls gelang es hierdurch eine rasche Verarbeitung des Zellmaterials und der Spülungslösungen zu verwirklichen. Ohne Berücksichtigung der Inkubationszeit für das Zellmaterial lag die Verarbeitungszeit bei etwa 45 Minuten.
Erhebliche Probleme ergaben sich bei der Ablösung der Kapillaren- gebundenen Zellen. Neben einer Vielzahl mechanischer Methoden wurde mit pH- Modulation und Detergens experimentiert.

Im Rahmen der Photodokumentation konnte gezeigt werden, dass die Kapillaren Zellen ausschließlich an den abhängenden Partien der Zirkumferenz an lagern. Es ist daher anzunehmen, das die Schwerkraft einen entscheidendem Einfluss auf die Anlagerung ausübt.

Zum Zeitpunkt meiner Experimente existierte bereits eine Reihe von erprobten und kommerziell erhältlichen Methoden zur Positiv- Selektion. Vergleichend mit den im Einzelnen beschriebenen Verfahren bin ich für Polyacrolein- Microspheres zu folgenden Ergebnissen gekommen:
In der Versuchsreihe zur *Spezifität* konnte gezeigt werden, dass die kapillargebundenen Zellen weitgehend spezifisch gebundene Zellen sind. Einschränkend muss gesagt werden, dass es in keinem der Versuche gelungen ist, viable Zellen vollständig von der Kapillare zu lösen. Eine Selektivität bei der Untersuchung der Ablösesuspension konnte nicht gezeigt werden.

Die *Viabilität* der kapillarengebundenen Zellen ist hoch. Eine Ausnahme hiervon bilden die nach mechanischer Ablösung auf der Kapillare verbliebenen Zellen und Zellen die mit einem Detergens von den Kapillaren gelöst wurden.

Eine Beurteilung der *Recovery* war mit den mir zur Verfügung stehenden Mittel insgesamt nicht zu realisieren. Stattdessen habe ich mich darauf beschränkt, den Zellanteil von positiv- selektierten Zellen zu bestimmen. Die Bestimmung dieses Anteils erfolgte in der Mehrzahl der Experimente durch Auszählung nach Immuntypisierung in der Suspension der abgelösten Zellen. Da auf diesem Weg keine positive Selektivität gezeigt werden konnte, wurden die Zellen auf der Kapillare immuntypisiert. Hier zeigte sich ein positives Selektionsergebnis.

Unter Berücksichtigung aller genannten Qualitätskriterien lässt sich zusammenfassend sagen, dass im Rahmen meiner Experimente *nicht* gezeigt werden konnte, dass Polyacrolein- Microspheres ein geeignetes Mittel zur Positivselektion von peripheren Blutzellen darstellen.

7 Literaturverzeichnis

1. Philip T, Guglielmi F, Chauvinin F, Hagenbeek A, Van Der Ley J, Bron D, Sonneveld P, Gisselbrecht C, Cahn JY, Harrousseau JL, Coiffier B, Biron P, Somers R: Autologous bone marrow transplantation versus conventional chemotherapie (DHAP) in relapsed Non-Hodgkin Lymphoma: Final analysis of the Parma Trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 14: 390 (1995)

2. Ball ED, Mills LE, Cornwell GC III, Davis BH, McMillan R, Spruce W, Miller W, Thopson L: Autologous bone marrow transplantation in acute myelogenous leucaemia using monolclonal antibody- purged marrow. *Blood* 75: 1119-1206 (1990)

3. Peters WP, Shpall EJ, Jones R, Olsen G, Bast RC, Gockerman J, Moore J: High-dose combination alkylating agents with bone marrow support as initial treatment for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 11: 1132-1143 (1993)

4. Viens P, Maranichi D, Legros M, Oberling F, Philip T, Herve P, Plagne R, Dufour P, Bergerat JP, Guastalla JP, Rozenbaum A, Carcassonne Y: High dose melphalan and autologous marrowrescue in advanced epithelial ovarian carcinomas: a retrospective analysis of 35 patients treated in France. *Bone Marrow transplant* 5: 227-233 (1990)

5. Peters WP, Ross M, Vredenburgh JJ, Meisenberg G, Marks L, Winer E, Kurtzburg J, Bast RC, Jones R, Shpall E: High dose chemotherapy with autologous marrow support as consolidation after standard adjuvant therapy for high-risk primary breast cancer. *J Clin Oncology* 11: 1132-1143 (1993)

6. Seeger RC, Reynolds PR: Treatment of high risk solid tumours with intensive therapy and autologous bone marrow transplantation. *Pediatr Clin North Am* 38: 393-424 (1991)

7. Lowry PA, Tabbara IA: Peripheral hematopoietic stem cell transplantation: current concepts. *Exp Hematol* 20: 937-942 (1992)

8. Sharp JG, Kessinger MA, Pirruccello SJ, Mash AS, Mann SL, DeBoer J, Sanger WG, Weisenburger DD: Frequency of detection of suspected lymphoma cells in peripheral blood stem cell collections. In: Dicke KA, Armitage JO, Dicke-Evinger MJ (Hrsg) Autologous Bone Marrow Transplantation V. *University of Nebraska Medical Center, Omaha,* S. 801-808 (1991)

9. Martin A, Pamphilon D, Cornish J, Oakhill A: A comparison of HLA-matched and mismatched unrelated donors (DU) BMT in children. *Exp Hematol* 22: 693 (1994)

10. Gratwohl A, Passweg J, Baldomero H, Urbano-Ispizua A, European Group for Blood and Marrow Transplantation: Hematopoietic stem cell transplantation activity in Europe 1999. *Bone Marrow Transplantation* 27: 899-916 (2001)

11. Sharp JC, Kessinger A, Mann S ,Crouse DA, Dicke JA, Masih A, Weisenburger DD: Detection and clinical significance of minimal tumour cell contamination of peripheral blood stem cell harvest. *Int J Cell Cloning* (suppl 1): 92-94 (1992)

12. Brenner M, Mirro J Jr, Hurwitz C: Autologous bone marrow transplantation for children with AML in first complete remission: use of marker genes to investigate the biology of marrow reconstitution and the mechanism of relapse. *Hum gen Ther* 2: 137-159 (1991)

13. Filipowich AH, Vallera DA, Youle RJ, Haake R, Blazer BR, Neville DM, Ramsay NK, McGlave P, Kersey JH: Graft-versus-host disease prevention in allogenic bone marrow

transplantation . A pilot study using immunotoxins for T cell depletion in doner marrow. *Transplantation* 44: 62-69 (1987)

14. Reisner Y, Kapoor N, Kirkpatrick D, Pollack M, Dupont B, Good R, O`Reilly RJ: Transplantation for acute leucaemia with HLA-A and B nonidentical parental marrow cells fractioned with soybean agglutinin and sheep red blood cells. *The Lancet* 15: 327-331 (1981)

15. Civin Ci, Trischmann T, Kadan NS, Davis J, Noga S, Cohen K, Duffy B, Groenewegen I, Wiley J, Law P, Hardwick A, Oldham F, Gee A: Highly purified CD34-positive cells reconstitute Hematopoiesis. *J of Clin Oncology* 14: 2224-2233 (1996)

16. Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID: Monoclonal antibody 12-8 recognized a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood* 67: 842-845 (1986)

17. Rowley SD, Loken M, Radich J, Klunkle LA, Mills BJ, Gooley T, Holmberg L, McSweeney P, Beach K, MacLeod B, Appelbaum F, Bensinger WI: Isolation of CD34+ cells from blood stem cell components using the Baxter Isolex system. *Bone Marrow Transplantation* 21: 1253-1262 (1998)

18. Landsdorp PM, Dragowska W, Mayani H: Ontogeny-related changes in proloferative potential of human hematopoitic cells. *J Exp Med* 178: 787-791 (1993)

19. Shpall EJ, Gehling U, Cagnoni P, Purdy M, Hami L, Gee A: Isolation of CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Immunomethods* 5: 197-203 (1994)

20. Ishizawa L, Burgess J, Hardwick A, Hangoc G, Gee A, Law P: Selection of Hematopoietic Stem Cells. In: Wunder E, Sovalat H, Henon P, Serke S (Hrsg) The Mulhouse Manual, *Dayton, Ohio: AlphaMed Press*; S. 177-182 (1994)

21. Herikstad BV, Lien E: Selection of Hematopoietic Stem Cells. In: Wunder E, Sovalat H, Henon P, Serke S The Mulhouse Manual, *Dayton, Ohio: AlphaMed Press*; S: 149-160 (1994)

22. Dreger P, Viehmann K, von Neuhoff N, Krus D, Glass B, Kneba M, Mitsky P, Jopp P, Rautenberg P, Mills B, Schmitz N: A prospective study of positive/negative ex vivo B-cell depletion in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Experimantal Hematology* 28: 1187-1196 (2000)

23. Abonour R, Scott KM, Kunkel LA, Robertson MJ, Hromas R, Graves V, Lazaridis EN, Cripe L, Gharpure V, Traycoff CM, Mills B, Srour EF, Cornetta K: Autologous transplantation of mobilized peripheral blood CD34+ cells selected by immunomagnetic procedures in patients with multiple myeloma. *Bone Marrow Transplantation* 22: 957-963 (1998)

24. Mohr M, Dalmis F, Hilgenfeld E, Oelmann E, Zuhldorf M, Kratz-Albers K, Nolte A, Schmitmann C, Onaldi-Mohr D, Cassens U, Serve H, Sibrowski W, Kienast J, Berdel WE: Simultanous immunomagnetic CD34+ cell selection and B-cell depletion in peripheral blood progenitor cell samples of patients suffering from B-cell non –Hodgkin´s lymphoma. *Clinical Cancer Research* 7: 51-57 (2001)

25. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A: High-gradient magnitic cell separation with MACS. *Cytometry* 11: 231-236 (1990)

26. Shpall EJ, Jones RB, Bearman SI, Stemmer SM, Purdy MH, Heimfeld S, Berenson RJ: Positive selection of CD34+ hematopoietic progenitor cells for transplantation. *Stem Cells* 11: 48-49 (1993)

27. Lebkowski J, Schain LR, Okrongly D, Levinsky R, Hervey MJ, Okarma TB: Rapid isolation of human CD34 hematopoietic stem cells: purging of human tumour cells. *Transplantation* 53: 1011-1019 (1992)

28. Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID: Human hematopoietic precousers in long-term cultures: single CD34+ cells that lack detectable T cell, B cell, and myeloid antigens produce colony-forming cells when cultured with marrow stromal cells. *J Exp Med* 172: 355-361 (1990)

29. Shpall EJ, Jones RB, Franklin W, Curiel T, Bitter M, Claman H, Archer PG, Bearman S, Stemmer S, Myers S: Transplantation of enriched CD34 positive autologous marrow into breast cancer patients following high-dose chemotherapy: Influence of CD34+ peripheral blood progenitors and growth factors in engraftment. *J Clin Oncol* 12: 28-36 (1994)

30. Patriarca F, Damiani D, Fanin R, Grimaz S, Geromin S, Cerno M Sperotto A, Silvestri F, Zaja F, Baccarani M: High-dose therapy in multiple myeloma: effects of positive selection of CD34+ peripheral blood stem cells on hematologic engraftment and clinical outcome. *Haematologica* 85: 269-274 (2000)

31. Link H, Arseniev L, Bahre O, Battmer K, Kadar J, Jacobs R, Lohmann D, Casper J, Kuhl J, Schubert J, Diedrich H, Poliwada H: Combined transplantation of allogenic bone marrow and peripheral blood progenitor cells. *Blood* 84: 713a (1994)

32. Dunbar CE, Nienhuis A, Stewart FM, Quesenberry P, O´Slaughnessy J, Cowan K, Cottler-Fox M, Leitman S, Goodman S, Sorrentino BP: Genitic marking with retroviral vectors to study the feasibility of stem cell gene transfer and the biology of hematopoitic reconstitution after autologous transplantation in multiple myeloma, chronic myelogenous leukemia, or metastatic breast cancer. *Hum Gene Therapy* 4: 205-222 (1993)

33. Dunbar CE, Doren S, Sassel A, Fox M, Boine DM, O´Slaughnessy J, Sorrention B, Donahue R, McDonogh D, Karlsson S, Liu J, Walsh C, Nienhuis AW: Gene transfer to hematopoietic stem cells. *Cancer Gene Ther* 1: 142 (1994)

34. Gupta D, Bybee A, Cooke F, Giles C, Davis JG, McDonald C, Armitage SE, McGuigan D, Lyttelton MP, Kanfer EJ, Apperley JF, Samson D: CD34+ selected peripheral blood progenitor cell transplantation in patients with multiple myeloma: tumour cell contamination and outcome. *British Journal of Haematology* 104: 166-177 (1999)

35. Redding C, Sasaki D, Leemhuis T, Tichenor E, Chen B, Tsao M, Gazitt Y, Tricot G, Hoffman R: Clinical scale purification of CD34+Thy+Lin- stem cells from mobilized peripheral blood by high-speed fluorescence-activated cell sorting for use as an autograft for multiple myeloma patients. *Blood* 84: 399a (1994)

36. Michallet M, Philip T, Philip I, Godinot H, Sebban C, Salles G, Thiebaut A, Biron P, Lopez F, Mazars P, Roubi N, Leemhuis T, Hanania E, Reading C, Fine C, Atkinson K, Juttner C, Coiffier B, Fiere D, Archimbaud E: Transplantaion with selected autologous peripheral blood CD34+Thy+ hematopoietic stem cells (HSCs) in multiple myeloma: impact of HSC dose on engraftment, safety and immune reconstitution. *Experimental Hematology* 28: 858-870 (2000)

37. Broxmeyer HE, Kurtzerg J, Gluckman E, Auerbach AD, Douglas G, Cooper S, Falkenburg JHF, Bard J, Boyse EA: Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation. *Blood Cells* 17: 313 (1991)

38. Moore KA, Deisseroth AB, Reading CL, Williams DE, Belmont JW: Stromal Support enhances cell-free retroviral transduction of human bone marrow long-term culture initiating cells. *Blood* 79: 1393-1399 (1992)

39. Margel S, Tenanbaum M, Fisher Inna: Methyl alpha-(hydroxymethyl) acrylate microspheres: design, synthesis characterization and use. *Journal of Colloid and Interface Science* 150: 22-35 (1992)

40. Beelen D.W, Peceny R, Elmaagacli A, Ottinger H, Kummer G, Opalka B, Seeber S, Schaefer U.W: Transplantation of Highly Purified HLA-Identical Sibling Donor Peripheral Blood CD34+ Cells without Prophylactic post-transplant Immunosuppression in Adult Patients with First Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia: Results of a Phase II Study. *Bone Marrow Transplant* 26: 823-829 (2000)

41. Després D, Flohr T.A, Uppenkamp M, Baldus M, Hoffmann M, Huber C, Derigs H.G: CD34+ Cell Enrichment for Autologous Peripheral Blood Stem Cell Transplantation by Use of the CliniMACS Device. J Hematother Stem Cell Res. 9: 557-564 (2000)

42. Richel D.J, Johnsen H.E, Canon J, Guillaume T, Schaafsma M.R, Schenkeveld C, Hansen S.W, McNiece I, Gringeri A.J, Bridell R, Ewen C, Davies R, Freeman J, Miltenyi S: Highly purified CD34+ Cells Isolated Using Magnetically Activated Cell Selection Provide Rapid Engraftment Following High-Dose Chemotherapy in Breast Cancer Patients. *Bone Marrow Transplant* 25: 243-249 (2000)

43. Handgretinger R, Lang P, Schumm M, Taylor G, Neu S, Koscielnak E, Niethammer D, . Klingebiel T: Isolation and Transplantation of Autologous Peripheral CD34+ Progenitor Cells Highly Purified by Magnetic-Activated Cell Sorting. *Bone Marrow Transplant* 21: 987-993 (1998)

44. Dolitzky Y, Sturchak S, Nizan B, Sela BA, Margel S: Synthesis, characterization and use of immobilized polyacrolein microspheres in diagnostics: a model determination of alpha 1-antitrypsin in human serum. *Anal Biochem* 220: 257-267 (1994)

45. Margel S: Affinity separation with polyaldehyde microsphere beads. *J Chromatogr* 462: 177-189 (1989)

46. Savin H, Marcus L, Margel S, Ofarim M, Ravid M; Treatment of adverse digitalis effects by hemoperfusion through columns with antidigoxin antibodies bound to agarose polyacrolein microsphere beads. *Am Heart J* 113: 1078-1084 (1987)

47. Dvilansky A, Aharon M, Riesenfeld G, Nathan I: Evaluation of a new polyacrolein microsphere (acrobead) protein A column: an in vitro study using the blood of patients with immune thrombocyticpenia or malignancies. *Transfusion* 32 :210- 214 (1992)

48. Margel S, Tenanbaum M, Gottlieb H E: Novel polymeric microspheres based on methyl alpha-(hydroxylmethyl)acrylate: synthesis and characterization. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 30: 1499-1502 (1992)

49. Margel S, Tenanbaum M, Fisher I. Methyl alpha-(hydroxylmethyl)acrylate microspheres: design, synthesis, characterization and use. *Journal of Colloid and Interface Science*: 150: 22- 35 (1992)

50. Margel S, Cohen E, Dolitzky Y, Sivan O; Surface modification of Polyacrolein Microspheres covalently bonded onto Polyethylene. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 30: 1103- 1110 (1992)

51. Edwards J C. Campath-1-(Wellcome): Notes for clinical investigators. Department of Clinical Immunology, Wellcome Research Laboratories, Beckenham, Kent, BR3 3BS, UK (1986)

52. Hale G, Swirsky D, Waldmann H, Chan L C:. Reactivity of rat monoclonal antibody Campath-1 with human leukaemia cells and its possible application for autologous bone marrow transplantation. *British Journal of Haematology* 60: 41-48 (1985)

53. Williams A. W6/32 a mouse antihuman leukocyte antibody. Characterization and culture. *Cell* 14: 9-20 (1978)

8. Danksagung

Allen Personen, die mir beim Anfertigen dieser Arbeit behilflich waren, sei ein herzliches Dankeschön gesagt.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. Thomas Schreiner für die Themenstellung und die Betreuung wären der Versuche sowie seine Hilfestellung bei der Erstellung und Korrektur des Manuskripts.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Professor Kubanek, der mir ermöglicht hat die Arbeit nach meiner Rückkehr nach Deutschland wiederaufzunehmen. Seine Vorschläge und Anregungen haben den Text abschließend geformt.

Herrn Dr. Wiesneth danke ich für die Supervision während des experimentellen Abschnitts sowie seine Ermutigung die Arbeit im Anschluss an meine Auslandsjahre zu Ende zu führen.

Ebenfalls möchte ich den Mitarbeiterinnen des KTM Labors an der DRK Blutspendezentrale danken und dabei insbesondere Frau Birgit Maccari, die bei technischen Unwegbarkeiten und organisatorischen Problemen immer Rat wußte.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau und meinen Kindern, die zugunsten der Dissertation auf meine Präsenz in der Familie verzichtet haben.

Herzlich gedankt sei auch Frau Jakobs, die die Kommunikation zwischen den Beteiligten aufrecht erhielt und die vielfach schwierigen Terminvereinbarungen organisiert hat.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Mutter für das Korrekturlesen des Texts und vielfache Vorschläge zur Verbesserung der Darstellung.

9 Anhang zu Material und Methode

(Vorversuche und Versuche zur Antikörperbindung)

Vorversuche mit Zellen im Einzelnen:

Vorversuch a:

Aus 12 Stunden altem EDTA Blut dreier Blutspenden wurden die mononukleären Zellen präpariert. Die gewonnene Zellfraktion wurde auf eine Zellzahl von 1000 /µl eingestellt. Die Resuspendierung erfolgte mit 0,5% BSA in PBS.
Kapillaren der Art `Glas´, `Amin´ und `Microspheres´ wurden über Nacht im Überkopfschüttler in 100µg/ml Campath IgM inkubiert. Nach Entnahme aus den Inkubationsröhrchen erfolgte das Waschen aufeinanderfolgend in 3 Röhrchen mit je 0,1% BSA in PBS.
Die mit dem Campath IgM beschichteten Kapillaren wurden nun für 2 Stunde im Überkopfschüttler mit mononukleären Zellen inkubiert, anschließend entnommen und aufeinanderfolgend in 3 Röhrchen mit je 0,1% BSA in PBS durch sanftes Kippen gewaschen.
Zur Auswertung wurden die Kapillaren in eine wassergefüllte Petrischale gegeben und im Inversionsmikroskop unter Durchlicht im Phasenkontrast auf das Vorhandensein von Zellen hin mikroskopiert.

Zur Ablösung der gebundenen Zellen erfolgte danach eine Zentrifugation der Kapillaren im Laborröhrchen für 10 Minuten mit 3000 U/min (815 x g). Nach Entnahme der Kapillaren wurde das Laborröhrchen auf ein Zellpellet am Röhrchenboden untersucht. Gegebenenfalls wurde dieses resuspendiert.
Weiter wurde versucht die gebundenen Zellen durch Rütteln bei 1000 U/min für 20 Minuten im Rüttler abzulösen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation und Sedimentierung der Zellsuspension. Ein am Röhrchenboden vorhandenes Pellet wurde auch hier resuspendiert.
Als weiterer Versuch der Ablösung wurde die Kapillare invertiert in das Laborröhrchen eingebracht und es erfolgte erneut die Zentrifugation mit 815 x g. Das weitere Prozedere entsprach dem oben genannten.

Vorversuch b

Die im Vorversuch a genannten Bedingungen wurden folgendermaßen variiert:
Es wurden nur frische Blutproben verwandt, Spenderblut wurde nicht gemischt. Als Ablösemethode wurde die Kapillare ohne Bodenkontakt zentrifugiert, indem sie in den Stopfen eingedrückt und gegen die Wand des Röhrchens immobilisiert wurde und somit bei der Zentrifugation ohne Bodenkontakt blieb.
Die zellarme Ablösesuspension wurde der Zytozentrifugation zugeführt: Hier wurde das Sediment im Laborröhrchen in geringem Volumen resuspendiert und bei 800 U/min (g x 217) 10 Minuten lang zentrifugiert. Der so entstanden Sedimentrasen wurde nach Pappenheim gefärbt.

Vorversuch c

Bei sonst gleichen Bedingungen wie im Vorversuch wurde bei der Präparation des mononukleäre Zellansatzes abschließend in Medium statt in 0,5% BSA resuspendiert. Außerdem wurde Campath IgG Antikörper anstelle von Campath IgM Antikörper eingesetzt. Die Inkubation der Kapillaren erfolgte wie in den vorangegangenen Versuchen. Wegen Flockenbildung in der Suspension sowie makroskopisch sichtbarer Klumpung auf den Kapillaren wurde der Versuch nicht weitergeführt.

Vorversuch d

In diesem Versuch wurden zwei identische Ansätze mit allen drei Kapillartypen in Zellsuspension inkubiert. Der erste Ansatz wurde ohne vorherige Ablösung bei Durchlicht im Phasenkontrast mikroskopiert. Der zweite Ansatz wurde nach Ablösung durch Schütteln im Vortexer für 30 Minuten auf Zellreste mikroskopiert. Die Ablösesuspension wurde wie in den vorangegangenen Experimenten der Zytozentrifugation zugeführt. Die Mikroskopie erfolgte wie oben nach Pappenheimfärbung im Zeiss Aristoplan unter Durchlicht.

Vorversuchsreihe e

Im ersten Versuchsteil wurde zur Verbesserung der Erfolgskontrolle bei sonst gleichen Versuchsbedingungen ein Abrollpräparat der inkubierten Kapillaren erzeugt:

Es wurden zwei Gruppen mit jeweils zwei Microspheres Kapillaren inkubiert:

1. Kapillaren, die nach dem oben beschriebenen Muster mit Campath 100 µg/ml (bei 20° C für 14h) vorbereitet waren.
2. Kapillaren, die alle Inkubationsschritte mit Ausnahme der Antikörperinkubation durchlaufen hatten.

Als Alternative zum Taumelschüttler für die Inkubation war zum Zwecke einer schonenderen Durchmischung der Bellydancer (Stovall Live Science Inc. Greensboro USA) eingesetzt worden. Diese Inkubationsmethode wurde auch in allen weiteren Experimenten angewandt.
Als Kapillaren wurden verwendet, `Glas´, `Amin´, `Microspheres´. Die Blockierung der freien Bindungsvalenzen erfolgte mit 0,1% BSA nach Antikörperinkubation für zwei Stunden im Überkopfschüttler; als Zellsuspension diente die mononukleäre Zellfraktion mit einer Zellkonzentration von 10 Mio./ml.
Nach der üblichen Spülung erfolgte für zwei Kapillaren jeder Gruppe das Abrollen auf einem Objektträger. Die so gewonnenen Präparate wurden luftgetrocknet und anschließend nach Pappenheim in typischer Weise gefärbt.
Aufgrund des Abrollvorgangs kommt es zu erheblicher Zelldestruktion welche keine exakte Auszählung auf dem Objektträger ermöglicht. Die Auswertung erfolgt daher in semiquantitativer Weise:

„0“ : keine abgelösten Zellen beobachtet
„+“ : vereinzelte Zellen
„++“ : vermehrte Zellzahl auch zellfreie Abschnitte
„+++“ : dichter Zellrasen

Im **zweiten Versuch** dieser Versuchsreihe wurden bei sonst gleichen Ausgangsbedingungen die Ablösemethoden variiert:
Nach Zentrifugation bei 543 x g und anschließender Mikroskopie wurden die Kapillaren in 0,2 mol/l Glycin bei pH3,5 gegeben. Der Ablöseversuch erfolgte für 5 min im Überkopfschüttler bei niedriger Umdrehungszahl gefolgt von erneuter Mikroskopie der Kapillaren nativ in der Petrischale unter dem Inversionsmikroskop.

Im Anschluss daran wurden die Kapillaren einem weiteren Ablöseschritt unterzogen: Unter gleichen Bedingungen wie für Glycin erfolgte die Einbringung in 1% Triton, gefolgt von erneuter Mikroskopie wie oben.
Die Auswertung der Kapillaren in Hinblick auf die Menge der angelagerten Zellen erfolgte analog der Auswertung auf dem Objektträger in semiquantitativer Weise:

„0“ : keine Zellen auf der Kapillare beobachtet
„0-+“: vereinzelte Zellen
„+“ : vermehrte Zellzahl, einzelne Zellen jedoch deutlich abgrenzbar
„++“ : z.T. dichter Zellrasen abwechselnd mit zellarmen Abschnitten
„+++“ : dichter Zellrasen

Für die Ablösesuspension der Microspheres Kapillare nach Triton 1% erfolgte das Waschen mittels zweimaliger Zentrifugation bei 489 x g für 10 Minuten und Resuspension in 0,5% BSA Lösung, die zweite Resuspension wurde mit geringem Volumen durchgeführt und anschließend nach Pappenheim gefärbt.

Vorversuch f

In diesem Versuch sollte die Spezifität der Anlagerung geprüft wurden: Es wurde als Inkubationslösung eine Untermischung aus 50% mononukleären Zellen und 50% Granulozyten hergestellt. Die Präparation der Granulozytensuspension erfolgte analog der MNC Präparation durch Dichteseparation. Als Erfolgskontrolle dienten wiederum die Zytozentrifugation und das Abrollpräparat mit anschließender Färbung nach Pappenheim.

Vorversuch g

In diesem Versuch wurden Kapillaren vom Typ `Glas´, `Amin´, `Microspheres´ auf ihr Bindungsverhalten mit und ohne Blockierung durch 1% BSA Lösung hin untersucht.
Auf die Inkubation in Antikörper wurde verzichtet, da das Augenmerk auf die unspezifische Bindung gerichtet war.
Die oben genannten Kapillaren wurden für 4 Stunden im Überkopfschüttler in 0,1% BSA inkubiert.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit 10 Mio./ml mononukleären Zellen. Als Kontrolle wurden zusätzlich einige Kapillaren im Ursprungszustand der Inkubation in der Zellsuspension zugeführt.
Die Auswertung der Ergebnisse entsprach dem Vorgehen in den vorangegangenen Versuchen.

Vorversuch h

Wie in Vorversuch e wurde eine Ablösemethode in Detergenzlösung untersucht. Weiter wurde der Frage nachgegangen, ob Kapillaren nach Ablösung weiter über ausreichende Bindungskapazitäten verfügen.
Die Vorbereitung erfolgte für die Kapillartypen `Glas´, `Amin´, `Microspheres´. Ein Teil wurde nach oben beschriebenem Muster mit Campath IgG 100 µg/ml inkubiert und anschließend in 0,1% BSA für 2 Stunden geblockt. Der zweite Teil der Kapillaren erfuhr nur die Blockierung in 0,1% BSA für 2 Stunden. Als Zellsuspension diente wie in den Vorversuchen mononukleäre Zellen mit einer Konzentration von 10 Mio./ml.
Nach Inkubation in der Zellsuspension erfolgte die Mikroskopie und im Anschluss die Einbringung der Kapillaren in 0,2 mol/l Glycin bei pH3 und die Zentrifugation bei 489 x g. Im Anschluss wurden die Kapillaren in der Petrischale unter Phasenkontrast mikroskopiert. Die Kapillaren wurden danach in 1% Tritonlösung eingebracht und erneut wie oben zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte erneut die Mikroskopie der Kapillare.
Das Zellpellet am Boden nach Zentrifugation wurde in geringem Volumen resuspendiert, auf einem Objektträger ausgestrichen, luftgetrocknet und nach Pappenheim gefärbt.
Die Campath positive Glaskapillare sowie die Campath positive Microspheres Kapillare wurden erneut in der mononukleären Zellsuspension inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Mikroskopie nativ in der Petrischale.

Vorversuch j

In diesem Versuch wurde eine Reihe von methodischen Änderungen vorgenommen: Es wurde mit einer konzentrierteren Blockungslösung von 0,5% BSA und einer verlängerten Inkubationszeit von 14h gearbeitet.

Da die Volumina der mononukleären Zellfraktion aus 2,3 ml Saarstedt EDTA- Röhrchen nicht ausreichend Material boten, wurde ab diesem Versuch Buffycoatfraktion aus der Produktion von Blutprodukten eingesetzt. Dadurch war eine Erhöhung der Zellkonzentration ebenso wie eine Erhöhung der Volumina für die Inkubationslösungen möglich. Das Material wurde von der Produktionsabteilung der DRK Blutspendezentrale Ulm zur Verfügung gestellt. Hierdurch war die Herstellung von bis zu 40 ml MNC Fraktion mit Leukozytenkonzentrationen von 10.000 Zellen/ µl möglich.

Außerdem wurde der Ablösevorgang modifiziert: Nach Zentrifugation mit 543 x g wurde eine weitere Zentrifugation mit 1358 x g angeschlossen.
Als Färbemethode für die Zellen in der Ablösesuspension wurde ab diesem Experiment anstelle der Pappenheim Färbung erstmals die Viabilitätsfärbung mit Ethidiumbromid und Acridinorange angewandt: Die Methode ermöglicht die Auszählung der Zellzahl in Lösung mittels der Neubauer- Zählkammer.
Dazu wurde, wie in den Vorexperimenten, das Zellpellet am Boden des Laborröhrchens in wenig 0,5% BSA resuspendiert und mit der Pipette eine geringe Menge Ethidiumbromid/ Acridinorange Gebrauchslösung zugegeben.
Die anschließende Auszählung in der Neubauerkammer erfolgte nach Verdünnung im Verhältnis 1:4. Ausgezählt wurden vier Quadranten. Das Zählergebnis wurden mit dem Faktor 10 multipliziert und ergab die Zellzahl pro 1 µl Suspension. Um die Zellzahl in der Ablösesuspension insgesamt zu erhöhen, wurden 3 identische Kapillaren inkubiert und anschließend dem Ablöseprozess unterzogen.
Die Mikroskopie der Kapillaren vor und nach Zentrifugation erfolgte weiterhin nativ und nur im Phasenkontrast, um Veränderungen im Bindungsverhalten durch den Farbstoff zu vermeiden.

Vorversuch k

In diesem Versuch entsprach die Vorbereitung der Kapillaren und der Zellsuspension der des Vorexperiments. Mit dem Ziel, die Inkubation unter noch mehr laminarer Umspülung der Kapillaren zu erreichen, wurden die Glaskapillaren zwischen zwei Objektträger eingespannt und mit Klammern am Boden einer Färbeküvette immobilisiert.

Die in den bisherigen Versuchen gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Vorbereitung der Kapillaren, des Ansatzes der Zellsuspension sowie der Inkubation wurden in allen folgenden Experimenten mit Zellen gleichermaßen angewandt und konstant gehalten:
Die Inkubation der Kapillaren erfolgte in Antikörperlösung Campath IgG 10 µg/ml und 20Mg/ml für 24h bei 4° C in Dunkelheit.
Blockierung der verbliebenen Bindungsvalenzen ebenfalls für 24h bei 4° C in Dunkelheit mit 0,5% BSA in PBS o. Ca.
Nach Präparation der mononukleären Zellfraktion erfolgte die Einstellung der Zellzahl unter Verwendung eines automatisierten Messverfahrens im Coulter Zellzählgerät (Model T, Beckman/Coulter, Fullerton CA, USA) auf 10 Mio. / ml.
Der Zellsuspension wurde EDTA Lösung zu einer Endkonzentration von 5 mmol/l zugesetzt.
Die Inkubation der Kapillaren erfolgte im „Bellydancer“ bei niedriger Umdrehungszahl und Raumtemperatur für 1 Stunde.

Alle für den Ablöseprozess angesetzten Lösungen enthielten 5 mmol/l EDTA.
Das Spülen der Färbeküvette und Kapillaren erfolgte durch zweimaliges vorsichtiges Ein- und Auspipettieren von 0,5% BSA + EDTA Lösung.

Kapillaren wurden dann vorsichtig entnommen und in der Petrischale im Inversionsmikroskop im Phasenkontrast betrachtet. Die Auswertung auf Zellbesatz erfolgte wie im **Vorversuch e** beschrieben semiquantitativ.
Nach erneutem Einpipettieren der BSA/EDTA Lösung erfolgte das Wiedereinsetzen der Kapillaren und die Ablösung im Taumelschüttler bei hoher Umdrehungszahl.
Die zwischen den beiden Objektträgern eingespannten Kapillaren wurden nun entnommen und die Zellzahl der Ablösesuspension bestimmt.
Nach Eintauchen der Kapillaren in Ethidiumbromid/ Acridinorange erfolgte die Betrachtung unter Fluoreszenzlicht im Leitz Aristoplan.
In diesem Versuch betrug die Antikörperkonzentration für Campath IgG AK 10µg/ml bzw. 20 µg/ml.

Es wurden folgende Kapillaren verwendet:

`Glas´ + 10 µg /ml Campath IgG
`Amin´ + 10 µg /ml Campath IgG
`Microspheres´ + 10 µg /ml Campath IgG sowie 20 µg /ml Campath IgG
`Microspheres mit geblockten Amingruppen´ + 10 µg /ml Campath IgG sowie 20 µg/ml Campath IgG.

Versuche mit Fuoreszenzantikörpern im Einzelnen

Versuch A:
Hier wurde untersucht, wie unten genannten Kapillarentypen `Glas´, `Amin´ und `Microspheres´ bei gleichen Inkubationsschritten unterschiedliche Fluoreszenz entwickelten.
Es standen zu diesem Zeitpunkt die folgenden genannten Kapillartypen zur Verfügung:

Kapillarenart	**Kurzbezeichnung**
Unbehandelte Glaskapillare	`Glas´
Kapillare mit ungeblockten Amingruppen	`Amin´
Kapillare mit kovalent gebundene Microspheres	`Microspheres´

Vor ihre Verwendung im Experiment wurden sie dreimal in PBS o. Ca. in Greiner Laborröhrchen 2,5ml gewaschen.
Die Kapillaren waren in zwei unterschiedlichen Campath- Antikörper Konzentrationen (Primärantikörper) vorbereitet worden. Jeweils vier Kapillaren eines jeden Typs wurden für 14h bei 4° C im Überkopfschüttler mit einer Konzentration von 10 µg/ml bzw. 100 µg/ml inkubiert. Nach anschließender dreimaliger Spülung mit PBS o. Ca. erfolgte die Blockierung der überschüssigen Bindungsvalenzen mit 0,5% BSA in PBS für 12h bei 20° C ebenfalls im Überkopfschüttler. Die anschließende Inkubation in 100µg GAM FITC (Sekundärantikörper) erfolgte bei 4° C bei Dunkelheit zwischen 30 Min und 2 Stunden. Hierbei waren die Kapillaren in 2,5 ml Laborröhrchen gelagert, indem sie mit dem Stopfen gegen die Wand des Laborröhrchens gedrückt wurden und somit immobilisiert waren. Dies sollte das Entstehen von Artefakte beim Gleiten im Laborröhrchen verhindern.

Nach erneutem dreimaligen Spülen durch vorsichtiges Herausnehmen der Kapillare und Tauchen in 0,5% BSA in PBS wurden die Kapillaren in oben beschriebener Weise mikroskopiert und fotografiert.

Versuch B

Hier wurden die Kapillaren aus Versuch A mit Kapillaren verglichen, welche vor der Inkubation in Primärantikörper (Campath der Konzentration 10 µg/ml bzw. 100 µg/ml) in 0,1% BSA Lösung für 2 Stunden geblockt worden waren. Alle übrigen Schritte waren identisch mit denen aus Versuch A.

In **Versuch C** wurde untersucht, ob eine Kürzung der Inkubationszeit in Proteinlösung vor Antikörperkontakt ebenfalls zu einer Blockung der freien Bindungsvalenzen führt. Die Kapillaren wurden hier vor der Einbringung in Primärantikörper für 30 Minuten in 0,1% BSA in PBS vorinkubiert.

In **Versuch D** wurden die beiden oben beschriebenen Verfahren - mit und ohne Vorblockierung - für die Kapillarentypen `Glas´, `Amin´ und `Microspheres´ gegenübergestellt und die Ergebnisse von zwei Auswertern beurteilt.

Versuchsreihe E:

In dieser Versuchsreihe wurden alle zur Verfügung stehenden Kapillartypen mit verschiedenen Inkubations- bzw. Blockierungsverfahren behandelt.

Es standen zu diesem Zeitpunkt die folgenden genannten Kapillartypen zur Verfügung:

Kapillarenart	Kurzbezeichnung
Unbehandelte Glaskapillare	`Glas´
Kapillare mit ungeblockten Amingruppen	`Amin´
Kapillare mit geblockten Amingruppen	`Amin gebl.´
Kapillare mit kovalent gebundene Microspheres	`Microspheres´
Kapillare mit Microspheres und gebl. Amingruppen	`Microspheres gebl.´

Vor ihrer Verwendung im Experiment wurden die Kapillaren dreimal in PBS o. Ca. in Greiner Laborröhrchen 2,5ml gewaschen.
Die einzelnen Inkubationsschritte der Inkubation werden im Folgenden beschrieben:

Verfahren 1: Kapillaren aller oben genannten Typen wurden mit 0,1% BSA in PBS Lösung für 30 Minuten vorblockiert und im Anschluss in Campath 50µg /ml wie in den obigen Versuchen für 14h im Überkopfschüttler bei 4° C inkubiert, es folgte dann die Blockierung der verbliebenen Bindungsvalenzen mit 0,5% BSA Lösung für 12h bei 20° C. Nach anschließendem dreimaligem Spülen wurden die Kapillaren nun in GAM FITC Antikörper einer Konzentration von 100µg /ml bei Dunkelheit und 4°C für 2 Stunden inkubiert. Nach erneuter Blockierung in 0,5% BSA für 12 Stunden erfolgte dann die Mikroskopie wie im Versuch A beschrieben.

Verfahren 2 : Alle Kapillartypen wie im Verfahren 1. Der erste Inkubationsschritt aus Versuch I - die Vorblockierung in 0,1% BSA - wurde ausgelassen. Alle sonstigen Schritte wurden konstant gehalten.

Verfahren 3: Wiederum alle Kapillartypen wie im Versuch I. Die Inkubationsschritte bestanden jedoch nur aus Vorblockierung in 0,1% BSA in PBS für 30 Minuten und anschließender Inkubation in GAM FITC Antikörper sowie der folgenden Schritte wie oben beschrieben.

Verfahren 4: Hier wurde gegenüber Verfahren III auch auf die Vorblockierung verzichtet, sodass alle Kapillartypen nur in GAM FITC Antikörper und anschließender Blockierung inkubiert wurden.

Verfahren 5: Anstelle der kurzen Vorblockierung mit 0,1% BSA wie in Verfahren III wurden die Kapillaren für 12h in 0,5% BSA geblockt, bevor sie mit GAM- FICTS Antikörper in üblicher Weise inkubiert wurden. Das übrige Vorgehen entsprach dem oben beschriebenen.

Folgendes Schema dient der Übersicht über die Versuchsreihe:

Verf. I	Kap.	+ BSA 0,1% + Campath + BSA 0,5% + GAM-FICT + BSA 0,5%
Verf. II	Kap.	+ Campath + BSA 0,5% + GAM-FICT + BSA 0,5%
Verf. III	Kap.	+ BSA 0,1% + GAM-FICT + BSA 0,5%
Verf. IV	Kap.	+ GAM-FICT + BSA 0,5%
Verf. V	Kap.	+BSA 0,5% + GAM-FITC + BSA 0,5%

Ablösung von Sekundärantikörper

Versuchsreihe F:

In den folgenden beiden Versuchen dieser Versuchsreihe wurde anhand des Ablöseverhaltens von Sekundärantikörpern geprüft, ob die in den obigen Versuchen erzeugte Bindung von Fluoreszenzantikörper an die Campath- beladenen Microspheres dem Modell einer Antikörper- Antigenbindung entspricht.

Hierzu wurden Kapillaren vom Typ `Glas´, `Microspheres´ und `Microspheres mit geblockten Amingruppen´ in Campath Antikörpersuspension der Konzentration 10 µg/ml und 100 µg/ml wie oben inkubiert. Nach anschließender dreimaliger Spülung mit PBS o. Ca. erfolgte die Blockierung der überschüssigen Bindungsvalenzen mit 0,5% BSA in PBS für 12h bei 20° C ebenfalls im Überkopfschüttler. Die anschließende Inkubation in 100µg GAM- FITC erfolgte bei 4° C bei Dunkelheit zwischen 30 Min und 2 Stunden. Die Beladungsvorgänge, welche exakt denen der vorigen Versuche entsprachen, wurden im **ersten Teilversuch** durch Blockierung in 0,1% BSA Lösung für 1h abgeschlossen. Im **zweiten Teilversuch** erfolgte die Blockierung durch 0,5% BSA Lösung für 14h im Überkopfschüttler. Es folgte nun die Herstellung einer 0,2 Molaren Glycin- Lösung und Einstellen des pH-Wertes durch Titration mit HCl auf pH3. Die Kapillaren wurden nun für 5 Minuten bei vorsichtiger Durchmischung im Taumelschüttler in der genannten Lösung inkubiert und danach dreimal in PBS o. Ca gespült.

Die Erfolgskontrolle erfolgte wie in den vorangegangenen Versuchen in der PBS gefüllten Petrischale unter Blau- Fluoreszenz am Inversionsmikroskop bzw. am Leitz Aristoplan unter Blau- Fluoreszenz und Durchlicht.

Zwei Untersucher haben die Präparate unabhängig nach den oben geschriebenen Kriterien für die Fluoreszenzauswertung beurteilt.

Anhang Ergebnisse

Vorversuche und Versuche zur Antikörperbindung

Vorversuche im Einzelnen

Vorversuch a

Die Kapillaren wurden nach den im Methodenteil beschriebenen Inkubations- und Waschschritten in der PBS gefüllten Petrischale unter dem Inversionsmikroskop im Phasenkontrast auf das Vorhandensein von angelagerten Zellen hin mikroskopiert:
Die Kapillaren eines jeden Typs zeigten Zellbesatz. Die Kapillaren mit kovalent gebundenen Microspheres waren mit deutlich mehr Zellen besetzt. Daneben fanden sich auf den Kapillaren Zellklumpen.
Nach Zentrifugation der einzelnen Kapillaren fand sich am Boden des Laborröhrchens kein Zellpellet. Die direkte Mikroskopie im Phasenkontrast ließ keine abgelösten Zellen erkennen. Ebenfalls nach Zentrifugation der invertierten Kapillare ließen sich keine abgelösten Zellen nachweisen.
Es wurde vermutet, dass die beobachtete Klumpung an den Kapillaren mit dem Zellmaterial zusammenhing. In den folgenden Versuchen wurden daher nur frische Blutproben verwandt, auch auf das Mischen von Blutproben wurde verzichtet. Ebenfalls sollte die Nachweismethode für die abgelösten Zellen sensibler sein.

Vorversuch b

Zur Verbesserung der Sensitivität für den Nachweis von abgelöstem Zellmaterial wurde ab diesem Vorversuch die im Methodenteil beschriebene Zytozentrifugation verwandt.
Die Auswertung der nach Pappenheim gefärbten Präparate der Ablösesuspension ergab weiterhin sehr wenig Zellmaterial sowie Zelltrümmer bei allen drei Kapillartypen. In den Präparaten von Microspheres- Kapillaren ließen sich mehrere stark angegriffene mononukleäre Zellen erkennen.

Vorversuch c

Statt 0,5% BSA wurden die mononukleären Zellen nach MNC Präparation in Medium resuspendiert. Bei allen drei Kapillarentypen kam es während der Inkubation zur Klumpung. Die Kapillaren waren makroskopisch erkennbar mit Zellklumpen besetzt.

Vorversuch d

Bei gleichen Inkubationsbedingungen wie in den Vorversuchen wurden zwei parallele Ansätze der drei Kapillarentypen `Glas´, `Amin´, `Microspheres´ nach Ablösung im Inversionsmikroskop untersucht. Bei den Kapillaren vor Ablösung fanden sich massenhaft Zellen, zum Teil in Klumpen, auf den Kapillaren vom Typ `Amin´ und `Microspheres´. Kaum Zellbesatz fand sich dagegen auf den unbeschichteten Glaskapillaren.

Die Microspheres Kapillaren, die nach Ablöseversuch auf dem Schüttler mikroskopiert wurden, zeigten eine große Menge angelagerter Zellen, dagegen fanden sich sehr wenige Zellen und einige Zelltrümmer auf den Aminkapillaren.

Die Ablösesuspensionen wurden wie in den vorangegangenen Versuchen der Zytozentrifugation zugeführt:

Bei den Präparaten von Glaskapillaren waren nur vereinzelte Zellfragmente/ Verunreinigungen sichtbar.

Für die Aminkapillaren war die Mikroskopie der Ablösesuspension negativ.

In den Präparaten von Microspheres Kapillaren waren Zytoplasmaanteile von Zellen, dagegen keine Zellkerne sichtbar.

Vorversuchsreihe e

Nach der im Methodenteil beschriebenen Änderung der Inkubationsbedingungen erfolgte die Behandlung der Kapillaren nach folgendem Muster:

Verfahren 1: Kapillare + Campath IgG 100µg/ml + 0,1% BSA für 2h + Zellsuspension

Verfahren 2: Kapillare + 0,1% BSA für 2h + Zellsuspension

Nach Inkubation der Kapillaren wurden im **ersten Versuchsteil** Abrollpräparate auf Objektträgern gefertigt und diese im Anschluss nach Pappenheim gefärbt. Die Auswertung erfolgte in semiquantitativer Weise durch Mikroskopie.

Tabelle 12: **Ergebnisse der Abrollpräparate**

Nach Abrollen der Kapillaren auf dem Objektträger und anschliessende Färbung nach Pappenheim werden die Präparate mikroskopiert wobei das „+“ Zeichen semiquantitativ die Zahl der beobachteten Zellen angibt:

	Glas	Amin	Microspheres
Verf. 1	+++	0 - +	++
Verf.2	0	0 - +	0 - +

Die Auswertung richtete sich nach folgenden Kriterien:

0	=	keine Zellen auf der Kapillare beobachtet
0-+	=	vereinzelte wenige Zellen
+	=	geringe Zellzahl, auch zellfreie Abschnitte
++	=	Abschnitte mit dichtem Zellbesatz, auch zellarme Abschnitte
+++	=	dichter Zellrasen

In allen Präparaten war es zu einer erheblichen Zelldestruktion gekommen

Es zeigte sich hier erwartungsgemäß, dass in Abwesenheit von spezifischem Antikörper nur eine schwache Anlagerung der Zellen an die Kapillaren stattfand. Bemerkenswert erscheint, dass auch die Glaskapillaren nach Antikörperinkubation erheblich Zellen gebunden haben. Verantwortlich hierfür könnte die Eigenschaft von Glas angesehen werden, Protein an seiner Oberfläche zu binden. Die so erfolgte Adhärenz von Campath Antikörper kann als verantwortlich für die Zellbindung angesehen werden.

Im **zweiten Versuchsteil** dieser Versuchsreihe wurde bei sonst gleichen Ausgangsbedingungen ein Ablöseversuch mit pH Modulation mittels 0,2 Mol Glycin (bei pH3,5) sowie ein weiterer Ablöseversuch mit Triton 1% unternommen.
Die Nativmikroskopie der Kapillaren in der Petrischale erfolgte nach der Inkubation in Zellsuspension sowie nach jedem Ablöseschritt.

Tabelle 13: Zellbesatz nach pH- Modulation und Detergens

Als Bewertungskriterien für die Zellzahl auf den Kapillaren gelten wie bei der Mikroskopie der nach Pappenheim gefärbten Objektträgerpräparate die unter Tabelle a genannten semiquantitativen Größen

	Glas	Amin	Microspheres
Verf. 1			
vor Ablösung	+++	+++	++
nach Glycin pH 3	+++	+++	++
nach Triton	0	0	0
Verf.2			
vor Ablösung	0 - +	+++ (Klumpen)	++
nach Glycin pH 3	0 - +	+++	+
nach Triton	0	0	0

In Ergänzung zu den Ergebnissen aus Tabelle b wurde die Ablösesuspension aus Verfahren I, Microspheres, nach Triton wie im Material und Methodenteil beschrieben mikroskopiert: Es zeigten große Mengen von Zellfragmenten sowie Zellklumpen, jedoch keine intakten Zellen.

Leider konnte bei den beschichteten Kapillaren keine Selektivität der Antikörper gezeigt werden, da in den zuvor ausschließlich mit Albumin inkubierten Kapillaren gleich viele Zellen wie in den mit Campath inkubierten Kapillaren nachweisbar waren.

Ferner zeigte sich, dass adhärente Zellen durch Glycin nicht, durch Triton Lösung jedoch praktisch vollständig von den Kapillaren gelöst wurden.

Die Ergebnisse aus dieser Versuchsreihe zeigen zwei wesentliche Probleme auf:

1. Antikörper werden nicht allein, wie im Modell angenommen, durch kovalente Bindung an Kapillaren gebunden. Die Adhärenz von Protein an Glasoberflächen führt dazu, dass anhaftende Antikörper Targetzellen an die Kapillare binden.
2. Zellen werden unspezifisch – in diesem Falle in Abwesenheit von Antikörper - an Kapillaren gebunden.
3. Gebundene Zellen lassen sich kaum mehr von der Kapillare lösen. Die im Versuch verwandte mechanische Methode sowie die pH Modulation bleiben erfolglos. Die Ablösung mittels Detergens ist wohl erfolgreich, führt jedoch zum massenhaften Zelltod.

Vorversuch f

In diesem Experiment wurde die Spezifität der Bindung von Zellen an die Kapillaren untersucht. Als Zellsuspension diente eine Mischung aus 50% mononukleären Zellen und 50% Granulozyten. Durch die Verwendung der genannten Untermischung hatte ich erhofft, die Selektivität des Verfahrens zeigen zu können, ohne von Campath auf einen anderen Antikörper wechseln zu müssen: Wie im Abschnitt 2.2 Antikörperwahl über die Charakteristika von Campath Antikörper beschrieben, bindet dieser vornehmlich Lymphozyten. Da jedoch auch eine Affinität zu bestimmten Gruppen von Monozyten besteht, war eine gewisse Unschärfe der Versuchsvoraussetzungen gegeben (51). Bei sonst modellgemäßem Verhalten aller übrigen Versuchsschritte hätte sich jedoch ein deutliches Übergewicht an lymphozytären Zellanteilen einstellen müssen.

Die Inkubation erfolgte nur für Microspheres Kapillaren. Wie im vorangegangenen Versuch wurde nach Verfahren I (mit Campath AK) und Verfahren II (ohne Campath AK) inkubiert.

Die inkubierten Kapillaren wurden zweimal mikroskopiert:

1. im Anschluss an die Inkubation
2. nach Ablöseversuch

Bei der direkten Mikroskopie im Inversionsmikroskop nach Inkubation ergab sich folgendes Bild:

An der Kapillare mit Campath Ak Beladung war ein dichter Zellrasen sichtbar.

An der Kapillare ohne Campath Ak Beladung wurden nur vereinzelte Zellen gesehen.

Die Kapillaren wurden im Laborröhrchen bei 1000 U/min für 10 Minuten gerüttelt, anschließend erneut mikroskopiert. Hierbei zeigte sich, dass sich die Zellbeladung vor und nach Ablöseversuch nicht geändert hatte.

Nun erfolgte die Zentrifugation der Kapillaren mit 489 x g für 10 Minuten.

Die anschließende Zytozentrifugation der Ablösesuspension ergab ausschließlich Zelltrümmer in den nach Pappenheim gefärbten Objektträgerpräparaten für die Proben mit Campath ebenso wie für solche ohne Campath. Intakte Zellen konnten nicht gesehen werden.

Vorversuch g

Dieser Versuch diente der Untersuchung der unspezifischen Bindung von Kapillaren, die nach dem bisherigen Blockungsverfahren mit 0,1% BSA für 4 h behandelt waren. Als Vergleichsgröße wurden Kapillaren mitgeführt, welche in ungeblocktem Zustand in die Zellsuspension eingebracht wurden.

Verfahren I: Kapillare + Blockung + Zellsuspension

Verfahren II: Kapillare + Zellsuspension

Tabelle 14: **Zellbesatz auf den Kapillaren im Anschluss an die Inkubation**

Nach Inkubation in Zellsuspension werden die Kapillaren wie in den bisherigen Versuchen nativ mikroskopiert

	Glas	Amin	Microspheres
Verf. I	0	+	0 - +
Verf. II	+++	+	++

Das Ergebnis zeigt, dass das genannte Blockungsverfahren zwar wirksam aber nicht ausreichend war. Es verblieb eine (unspezifische) Bindungsaktivität an den geblockten Microspheres- Kapillaren. Ab Vorversuch j und für alle weiteren Experimente wird daher ein intensiveres Blockungsverfahren angewandt.

Vorversuch h

Ähnlich **Vorversuch e** werden hier die Ablösemethoden pH Modulation und Triton Lösung verglichen. Im Unterschied zum Vorversuch e erfolgte die Ablösung unter Zentrifugation. Vor Ablösung und nach jedem Ablöseschritt wurden die Kapillaren mikroskopisch auf Zellbesatz untersucht.

Vorbereitet waren 2 parallele Ansätze mit und ohne Campath:

Verfahren I: Kapillare + 100 µg/ml Campath + Blockung 0,1%BSA + Zellsuspension

Verfahren II: Kapillare + Blockung 0,1%BSA + Zellsuspension

Tabelle 15: **Zellbesatz in der Nativmikroskopie**

Vor und nach Ablösemanöver mit pH Modulation und mit Detergens werden die Kapillaren nativ mikroskopiert

	Glas	**Amin**	**Microspheres**
Verf. 1			
vor Ablösung	+++	+++	++
nach Glycin pH3	+++	+++	++
nach Triton	0	0 - +	0
Verf.2			
vor Ablösung	+	++	+++
nach Glycin pH3	+	++	+
nach Triton	0	0	0

Die Mikroskopie der Ablösesuspension aus beiden Verfahren zeigte nach Triton massenhaft Zelltrümmer, es wurden keine intakten Zellen gesehen.
Die Nativmikroskopie der Kapillaren `Microspheres mit Campath´ und `Glaskapillare mit Campath´ zeigte nach Reinkubation in Zellsuspension, dass beide Kapillaren erneut zahlreiche Zellen binden konnten (++).

Es wurde deutlich, dass Tritonlösung alle Zellen von der Kapillare ablöst. Dagegen konnte ein Vorteil der Zentrifugation von Kapillaren in Glycin pH3 nicht gezeigt werden.

Vorversuch j

In diesem Versuch wurden folgende im Material und Methodenteil beschriebenen Verfahrensänderungen umgesetzt:

1. Intensivierung der Blockung zur Verminderung der unspezifischen Bindung
2. Größere Volumina der MNC Fraktion, welche parallele Ansätze von mehreren Kapillaren einer Spezifikation (selbe Kapillarenart und Antikörperkonzentration) erlaubte
3. Erhöhte Umdrehungsgeschwindigkeit der Zentrifuge mit 1358 x g
4. Einsatz der Vitalfärbemethode mit Acridinorange und Ethidiumbromid und Auszählung der abgelösten Zellen in der Neubauer- Zählkammer.

Tabelle 16: **Zellbesatz der Kapillaren vor und nach Zentrifugation und Zellzählung in Suspension**

Kapillaren mit der Nummer 1, 2 und 3 sind für jeden Kapillarentyp/ Antikörperkonzentration jeweils identisch vorbereitet worden. Nativmikroskopie erfolgte vor und nach Zentrifugation mit 543 x g und 1358 x g. Auszählung erfolgte in der Neubauerzählkammer nach Sedimentierung der Zellen aus der Ablösesuspension und Resuspension in geringem Volumen.

	100 µg/ml Ak Konzentration							
Kapillare	**Glas**		**Amin**			**Mic**		
Ansatz	1.	2.	1.	2.	3.	1.	2.	3.
Vor Zenrif.	0	0-+	++	++	+	+++	++	+++
Nach Zentrif.	0	0	0	0-+	0	++	+	++
Zellzahl /µl	125	55	50	85	40	500	135	250

Bei der Betrachtung der Zellzahl der Ablösesuspension in Tabelle e wird deutlich, dass die Microspheres- Kapillaren eine deutlich größere Recovery ergaben. Trotz der erhöhten Zentrifugendrehzahl verblieben nach Zentrifugation eine erhebliche Zahl Zellen auf der Kapillare.

Eine weitere Erhöhung der Scherkräfte in der Bindungsebene der Antikörper- Zell-Bindung durch Steigerung der Umdrehungszahl war nicht möglich, da es im Versuch bereits zur Fraktur von 2 Kapillaren gekommen war.

Vorversuch k

Erstmals in diesem Versuch erfolgt die Inkubation wie im Material und Methodenteil beschrieben in einer Färbeküvette.

Die Kapillaren wurden

1. nach Inkubation in Zellsuspension und zweimaliger Spülung sowie
2. im Anschluss an den Ablösevorgang mikroskopiert.

Folgende Kapillaren wurden vorbereitet:

`Glas´	+ 10 µg/ml Campath IgG
`Amin´	+ 10 µg/ml Campath IgG
`Microspheres´	+ 10 µg/ml Campath IgG und + 20 µg/ml Campath IgG
`Microspheres mit geblockten Amingruppen´	+ 10 µg/ml Campath IgG und + 20 µg/ml Campath IgG

Tabelle 17: Anlagerung und Ablösung von Zellen bei unterschiedlichen Kapillartypen

Die Zahl nach Kapillarentyp gibt die Antikörperkonzentration in µg/ml wieder. Die Auszählung gibt den Zellbesatz nach Nativmikroskopie wieder

	vor Ablösung	nach Ablösung
Glas 10	+++	+++
Amin 10	++	++
Microspheres 10	+++	++
Microspheres 20	+++	+++
Microspheres gebl. 10	+++	++
Microspheres gebl. 20	+++	++

Bei der Betrachtung der Kapillaren fiel auf, dass an allen Typen eine große Zahl von Zellen angelagert war. Insbesondere fanden sich große Trauben von Zellen im hinteren Schaftbereich, wo die Kapillaren zwischen den Objektträgern gelagert waren. Auch im spitzennahen Bereich der Kapillaren fand sich ein dichter Zellrasen.

Weiter wurden die Objektträger auf anhaftende Zellen untersucht und auch hier konnten bei der Mikroskopie in der Petrischale große Zahlen von anhaftenden Zellen gefunden werden.

Es musste daher von einer erheblichen unspezifischen Bindung ausgegangen werden.

Versuche zur Antikörperbindung

Versuch A

In diesem ersten Versuch zeigte sich, dass es möglich ist, die Bindung von Antikörpern an Kapillaren vermittels eines fluoreszierenden Sekundärantikörpers zu visualisieren. Die Auswertung der Fluoreszenz (Tabelle 18) ergab deutliche Differenzen zwischen den verwendeten Kapillartypen `Glas´, `Amin´ und `Microspheres´, was sich sowohl in der Leuchtkraft der Fluoreszenz wie auch im Muster der fluoreszierenden Areale zeigen ließ. Unterschiede im Fluoreszenzmuster bestanden zwischen Microspheres Kapillaren und den Kontrollgruppen, indem erstere ein weniger homogenes Muster aufwiesen (spike- förmige Fluoreszenz).
Zwischen Kapillaren eines Typs, die in unterschiedlich konzentrierten Antikörperlösungen vorbereitet waren, konnten keine Differenzen in der Leuchtkraft gesehen werden.

Die Auswertung durch zwei Auswerter hat sich nach den folgenden Bewertungsmassstäben gerichtet:

0	=	keine Fluoreszenz
0-+	=	nur Rand der Kapillare fluoresziert schwach
+	=	einzelne kleine Flächen fluoreszieren
++	=	größere Flächen fluoreszieren (auch wenn inhomogen)
+++	=	gesamte Zirkumferenz fluoresziert

Tabelle 18: Fluoreszenzmarkierung unter Variation von Kapillartypen und Antikörperkonzentationen

Fluoreszenzmikroskopie nach Vorbereitung der Kapillaren in Campath IgG Antikörper und anschließender Fluoreszenzmarkierung mit Sekundärantikörper

	Auswerter 1		**Auswerter 2**	
	100µg	**10µg**	**100µg**	**10µg**
Glas	0 - +	0 -+	+	0 - +
Amin	+	+	0 - +	0 - +
Microspheres	++	++	++	+ - ++

Versuch B

Der Versuch beschäftigte sich mit der Frage der unspezifischen Bindung von Antikörpern an die Kapillaren. Hierzu wurden die Kapillaren vor dem Kontakt mit Primärantikörper in Proteinlösung (0,1% BSA für 2 Stunden) geblockt, bevor sie wie die Vergleichskapillaren in Campath und anschließend in Fluoreszenz- Antikörper inkubiert wurden.

Es zeigt sich in ein Bild wie in Tabelle 19. Die unspezifische Bindung von Campath-Primärantikörper bzw. Fluoreszenz- Sekundärantikörper trat nur in sehr geringem Masse auf. Wie bereits im Vorversuch war die Fluoreszenz auf Kapillaren vom Typ `Microspheres´ am stärksten ausgeprägt.

Die Auswertungskriterien für zwei unabhängige Auswerter galten wie oben beschrieben für alle Versuche mit Sekundärantikörper.

Tabelle 19: Auswirkung der Vorblockierung

Fluoreszenzbeurteilung der Kapillaren durch zwei Auswerter nach Blockung mit 0,1% BSA für 2 Stunden vor der Behandlung mit Campath AK und Fluoreszenz AK sowie unter Auslassung des Blockierungsschritts

	Auswerter 1		**Auswerter 2**	
	ungeblockt	**geblockt**	**ungeblockt**	**geblockt**
Glas	0 - +	0	+	0 - +
Amin	+	0	+	0 - +
Microspheres	++	0	++	0

Versuch C

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Dauer der Vorinkubation in Proteinlösung einen deutlichen Einfluss auf die Zahl der verbleibenden Bindungsvalenzen hat. Es zeigt sich in Tabelle 20 dass die Fluoreszenz des angelagerten Sekundärantikörpers auf den Kapillaren vom Typ `Microspheres´ der auf den *nicht* vorgeblockten Kapillaren der vorangehenden Versuche gleichkommt.

Tabelle 20: Verkürzung der Vorblockierungszeit

Fluoreszenzbeurteilung der Kapillaren durch zwei Auswerter nach Blockung der Kapillaren mit 0,1% BSA für 30 Minuten vor der Behandlung mit Campath AK 100µg/ml und Fluoreszenz AK

Glas		Amin		Mic	
Aw. 1	**Aw. 2**	**Aw. 1**	**Aw. 2**	**Aw. 1**	**Aw. 2**
0	+	0 - +	0 - +	+++	+++

Versuch D

Dieses Experiment zeigte im direkten Vergleich das Fluoreszenzverhalten von Kapillaren vom Typ `Glas´, `Amin´ und `Microspheres´ mit und ohne Vorblockierung in 0,1% BSA vor Inkubation in Campath Antikörperlösung. Obwohl die Fluoreszenz an den Kapillaren vom Typ `Microspheres´ hinter den Erwartungen zurückblieb, zeigte sich, dass die Vorblockierung wenig Einfluss auf die anschliessende Beladung dieses Kapillarentyps mit Antikörpern hatte. Dagegen lagerten unbehandelte Glaskapillaren in diesem Versuch ohne vorherige Blockierung stark an. Hierfür sind unspezifische Bindungskräfte der ungeblockten Glasoberfläche verantwortlich.

Tabelle 21: **Vergleich des Anlagerungsverhaltens von geblockten zu ungeblockten Kapillaren**

Fluoreszenzbeurteilung der Kapillaren durch zwei Auswerter ohne Blockung der Kapillaren vor der Behandlung mit Campath AK 100µg/ml und Fluoreszenz AK sowie *mit* Blockierung für 30 Minuten mit 0,1% BSA

	Glas		Amin		Mic	
	Aw. 1	**Aw. 2**	**Aw. 1**	**Aw. 2**	**Aw. 1**	**Aw. 2**
Ungeblockt	++	+++	0 - +	+	+	+
Geblockt	+	0 - +	0	+	+	++

Versuchsreihe E

In den beiden Versuchen wurden noch einmal alle bisher verwandten Variationen der Inkubationsschritten angewandt. Erstmalig standen für dieses Experiment Kapillaren vom Typ `Amin mit geblockten Amingruppen´ sowie `Microspheres mit geblockten Amingruppen´ zur Verfügung.

Folgende Liste bietet eine Übersicht über die versuchten Verfahren. Einzelheiten der in der Übersicht aufgeführten Verfahren sind im Methodenteil dieses Versuches beschrieben.

Verf. I	Kap.	+ BSA 0,1%	+ Campath	+ BSA 0,5%	+ GAM-FICT + BSA 0,5%
Verf. II	Kap.		+ Campath	+ BSA 0,5%	+ GAM-FICT + BSA 0,5%
Verf. III	Kap.			+ BSA 0,1%	+ GAM-FICT + BSA 0,5%
Verf. IV	Kap.				+ GAM-FICT + BSA 0,5%
Verf. V	Kap.			+BSA 0,5%	+ GAM-FITC + BSA 0,5%

Tabelle 22: **Immunfluoreszenzen bei den genannten Verfahren für Microsphereskapillaren**

Fluoreszenzbeurteilung der Kapillaren durch zwei Auswerter

	Verf. I		**Verf. II**		**Verf. III**		**Verf. IV**	
	Aw. 1	**Aw. 2**	**Aw. 1**	**Aw. 2**	**Aw. 1**	**Aw. 2**	**Aw. 1**	**Aw. 2**
Microspheres	++	+	+++	+++	+	0 - +	+++	+++

.

Tabelle 23: **Immunfuoreszenzen vergleichend für verschiedene Kapillartypen**

Fluoreszenzbeurteilung der Kapillaren durch zwei Auswerter

	Verf. I		**Verf. II**		**Verf. IV**		**Verf. V**	
	Aw. 1	**Aw. 2**	**Aw. 1**	**Aw. 2**	**Aw. 1**	**Aw. 2**	**Aw. 1**	**Aw. 2**
Glas	0	0 - +	+++	+++	+++	+++	0	0
Amin	++	0 - +	0 - +	+	++	++-++	0	0
bAmin	+	+	+	++	0 - +	+	0	0
Microspheres	++	++	+	++	++	+++	0	0
bMicrosph.	+	+	++	+++	++	++	0	0

Es zeigte sich bei Verfahren III in Tab. 22 und Verf. I in Tab. 23, dass die Vorblockierung mit BSA 0,1% für 30 Minuten keine konstanten Ergebnisse lieferte und möglicherweise wie bereits in Experiment D zu einem zu hohen Verlust an bindungsfähigen Amingruppen führte. In den weiterführenden Zellexperimenten wurde daher auf die Vorblockierung verzichtet.
Verfahren V bestätigte das Ergebnis aus den vorangegangenen Versuchen: Bei ausreichend langer Inkubation in Proteinlösung lassen sich die Bindungsvalenzen auf allen Kapillarentypen wirksam blockieren.

3.3 Ablösen von Sekundärantikörper

Versuchsreihe F

Für die beiden Teilversuche erfolgten jeweils zwei parallele Ansätze mit gleich behandelten Kapillaren. Das Ergebnis ist in den Tabellen 24 und 25 jeweils mit 2-fachem parallelem Ansatz dargestellt.
Unter den Bedingungen von Teilversuch 2 (Tabelle 25) stellte sich deutlicher als in Teilversuch 1 (Tabelle 24) dar, dass die Bindung von Sekundärantikörper an Microspheres- Kapillaren unter pH Absenkung (nach ausreichender Blockierung der unspezifischen Bindungsvalenzen) reversibel ist. Sekundärantikörper ließen sich dagegen kaum von Glaskapillaren lösen.

Tabelle 24: Ablöseverhalten von Sekundärantikörper unter ph-Modulation und Detergens

Fluoreszenzbeurteilung der Kapillaren durch zwei Auswerter für Kapillaren inkubiert in Campath IgG 100µg/ml, Blockierung mit **0,1% BSA für 1h** und Inkubation in GEM-FITC Fluoreszenz AK. Die Tabellen 7a + b zeigen die Bewertung der Fluoreszenzintensität nach Ablöseversuch mittels Waschen in PBS, saurer Lösung und Detergens

1. Parallelansatz:

	Glas		Amin		Mic	
	Aw. 1	**Aw. 2**	**Aw. 1**	**Aw. 2**	**Aw. 1**	**Aw. 2**
nach Fluoreszenzantikörper	++	++	0	+	++	++
nach 3x Waschen in PBS	++	++	0 - +	0	++	++
nach Glycin pH3	++	++	0 - +	0	+	+
nach 1% Triton	++	+	0	0	+	+ - ++

2. Parallelansatz

	Glas		Amin		Mic	
	Aw. 1	**Aw. 2**	**Aw. 1**	**Aw. 2**	**Aw. 1**	**Aw. 2**
nach Fluoreszenzantikörper	+	0 - +	0	0	+ - ++	++
nach 3x Waschen in PBS	+	+	0	0 - +	+ - ++	+
nach Glycin pH3	0	0	0 - +	0	0	0 - +
nach 1% Triton	0	0	0	0	0	0

.

Tabelle 25: Nach wirksamerer Blockierung Ablösung verbessert

Fluoreszenzbeurteilung der Kapillaren im Anschluss an Waschschritte für Kapillaren inkubiert in Campath IgG 100µg/ml, Blockierung mit **0,5% BSA für 14h** und Inkubation in GEM-FITC Fluoreszenz AK. Die Tabellen 8a + 8b zeigen die Bewertung der Fluoreszenzintensität nach Ablöseversuch mittels Waschen in PBS und nach Waschen in saurer Lösung

1. Parallelansatz:

	Glas		Mic geblockt		Mic	
	Aw. 1	**Aw. 2**	**Aw. 1**	**Aw. 2**	**Aw. 1**	**Aw. 2**
nach Fluoreszenzantikörper	++	+++	++	++ - +++	+++	++
nach 3x Waschen in PBS	++	++	++	++	+++	++
nach Glycin pH3	++	+	0 - +	0	0 - +	0

2. Parallelansatz:

	Glas		Mic geblockt		Mic	
	Aw. 1	**Aw. 2**	**Aw. 1**	**Aw. 2**	**Aw. 1**	**Aw. 2**
nach Fluoreszenzantikörper	++	++	++	++	0 - +	++
nach 3x Waschen in PBS	+	++	++	++	+++	++
nach Glycin pH3	+	++	0	0	0	0

Tabelle 26: Wirksame Blockierung der verbliebenen Bindungsvalenzen

Die vollständige Abwesenheit von Fluoreszenz nach Blockierung der Bindungsvalenzen auf den Microspheres zeigt die Wirksamkeit der Behandlung der Kapillaren mit 0,5% BSA für 14h

Kontrollen	**Fluoreszenz**
Microspheres Kapillare nach Inkubation in Sekundärantikörper	+++
Microspheres Kapillare nach Block und Sekundärantikörper	0

Aus Tabelle 24 im Vergleich mit Tabelle 25 lässt sich ablesen, dass die Blockierung der überschüssigen Bindungsvalenzen durch höhere BSA Konzentration und längere Einwirkzeiten wirksamer wird.

Tabelle 26 verdeutlicht die Wirksamkeit der genannten Blockierung. In den weiterführenden Versuchen mit Zellen wurde daher eine Blockierung mit BSA 0,5% für 14 Stunden durchgeführt.

Die nahezu vollständige Ablösung von Sekundärantikörper ließ deutlich werden, dass die Bindung tatsächlich wie angenommen dem Modell einer Antigen- Antikörperbindung entspricht.